annales de technologie agricole

Trimestriel

1977

Vol. 26 - N° 2

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

Reproduction, même partielle, interdite sans autorisation des auteurs
et de l'Institut national de la Recherche agronomique
à l'exception des résumés

Ann. Technol. agric., 1977, **26** (2), 119-132

Some physicochemical characteristics of horse bean lipoxygenase (*) *(Vicia faba L.)*

J. NICOLAS and R. DRAPRON

Laboratoire de Technologie Alimentaire de l'I.N.R.A.
C.E.R.D.I.A. 91305 Massy (France)

Summary

Two fractions 1 and 2 of lipoxygenase (EC.1.13.11.12) have been purified from horse bean (Vicia faba L.). Fraction 1, the most important in quantity, has been studied in more details. Steady-state kinetics show that substrate fixation follows an ordered mechanism in which oxygen first binds to the enzyme before it fixes linoleic acid. Optimum pH is close to pH 6.8, optimum temperature is 25 °C for the two isolated fractions. In the absence of Tween 20, calcium ion is an activator for horse bean lipoxygenase at pH 7. However, in phosphate buffer an optimum of calcium concentration exists, the value of which strongly depends from the molarity of the buffer. This optimum does not exist when M.E.S. is taken as buffer. These results are discussed. The amino acid compositions do not show essential differences for the two fractions. The presence of one atom of iron per mole of protein has been determined in fraction 1. Molecular weights, determined by ultracenrifugation, are respectively 85,000 for fraction 1 and 66,000 for fraction 2.

Key-Words: horse bean, lipoxygenase.

Introduction

The enzyme lipoxygenase (EC.1.13.11.12) is present in numerous plants. It acts first on free fatty acids which have in their molecules the system cis-cis 1,4 pentadiene with the intermediary methylene group in the ω 8 position. By incorporation of molecular oxygen, the primary product formed is a hydroperoxide at the C9 or C13 position depending on the origin of the lipoxygenase used (HAMBERG, 1971) or the pH of the reaction (CHRISTOPHER *et al.*, 1972 a). The hydroperoxides contain a conjugated diene which exhibits an absorption maximum at 234 nm, thus permitting its direct spectrophotometric assay.

The great majority of works has been on lipoxygenase I from soyabean (nota-

(*) Présenté au Symposium International I.S.F. « Lipases et lipoxygénases d'origine végétale », Marseille 30 août-4 septembre 1976.

tion introduced by CHRISTOPHER *et al.*, 1970), which is in fact an exception since its optimum pH is pH 9; all other lipoxygenases exhibit a pH optimum near neutrality or slightly acid. We began the study of horse bean lipoxygenase because of its technological implications in french breadmaking (DRAPRON *et al.*, 1974). Compared to other rich sources of lipoxygenase, activity at pH 7 of horse bean flour is slightly less than that of pea flour and 2 to 2.5 times less than that of soyflour at pH 9.

Material and methods

The starting material was a horse bean flour obtained by an industrial milling of beans from Egypt, kindly given by Les Grandes Minoteries à Fèves de France (Marseille).

Lipoxygenase assays

The activity was determined by the polarographic method with an « Oxygraph Gilson » fitted with a Clark electrode (MITSUDA *et al.*, 1967). The preparation of substrate was by the method of SURREY (1964). 0.56 g of pure linoleic acid (Fluka) was dissolved in 10 cm^3 of phosphate buffer (100 mM, pH 6.85) with 0.2 cm^3 of Tween 20, the solution was clarified by addition of a few drops of NaOH (N) and made up to 200 cm^3 with the phosphate buffer. This gave a stock solution which was usable for four days if stored at 4 °C. All solutions were deprived of oxygen by bubbling nitrogen through them for a few minutes. Just before use, the stock solution was diluted twice with distilled water and adjusted to pH 6.85 with phosphoric acid (M). The solution was then aerated at 25 °C for 10 minutes. Depending on the activity of the enzyme solution, 2.7 to 3 cm^3 of substrate was pipetted into a 3 cm^3 cuvet and no more than 0.3 cm^3 of the enzyme solution added and the oxygen consumption was recorded as a function of time. For the study of the oxygen concentration effect on the activity, different oxygen concentrations were obtained by bubbling pure oxygen or nitrogen at 25 °C, for different times. In the case of the calcium effect, a stock solution of 15 mg per cm^3 of linoleic acid in absolute ethanol was prepared. A suitable quantity of this solution, never more than 0.1 cm^3, was added to 3 cm^3 of the buffer solution which contains the calcium as calcium chloride.

One enzyme unit (ULPX) corresponded to the consumption of one micromole O_2 per minute. The specific activity was expressed as number of enzyme units per mg of protein determined by the Folin's reagent (LOWRY *et al.*, 1951) using bovine serum albumin as the standard.

Amino acid analyses

Samples of the purified enzymes were dialysed three times against distilled water and lyophilised. Aliquots were hydrolysed in HCl at 110 °C in sealed, evacuated tubes. Analyses were performed in duplicate for three times of hydrolysis (24, 48 and 72 hours) according to the method of SPACKMAN *et al.* (1958). Tryptophan was determined by the spectrum of the protein in NaOH (N/10) (BEAVEN and HOLIDAY, 1952) and colorimetrically by the method of GAITONDE and DOVEY (1970). Half-cystine and methionine were determined as cysteic

acid and methionine sulfone after performic acid oxidation according to the method of MOORE (1963). Free sulfhydryl groups were determined in a dissociating medium with the dimethylaminodiphenylcarbinol reagent (PIERCE *and Co.*) by the method of ROHRBACH *et al.* (1973).

Iron determination

The protein sample was first dialysed against 10^{-3} M E.D.T.A., then three times against deionized water and lyophilised. Iron content was determined colorimetrically at 512 nm by dissolving the protein in a phosphate buffer (50 mM, pH 7.1) containing β-mercaptoethanol (10 mM) and o-phenantroline (10 mM). A calibration curve was made with ferrous ammonium sulfate dissolved in the same buffer solution.

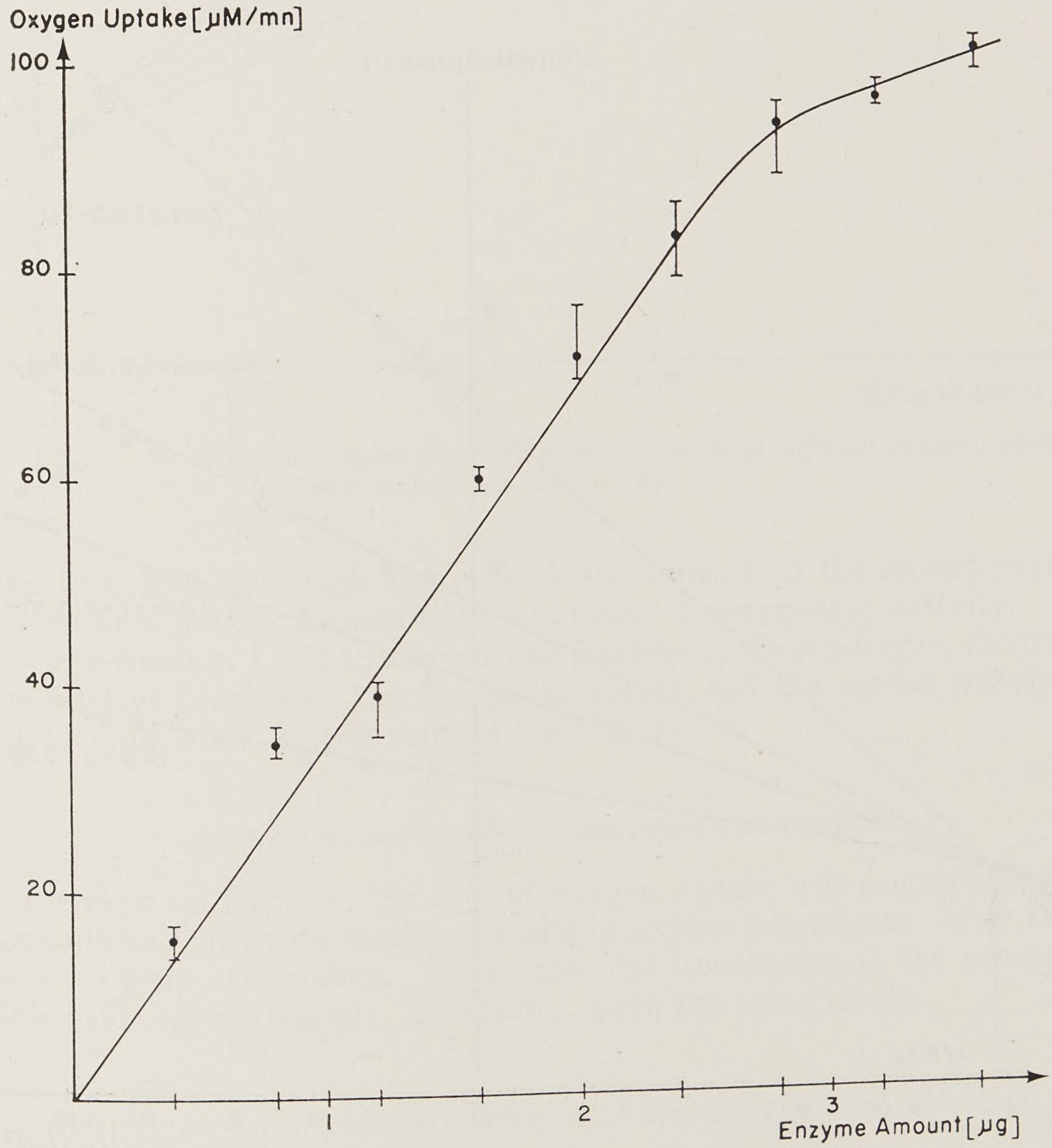


FIG. 1. — *Relationship between enzyme amount and initial rate of oxygen uptake. 0.3 cm³ of a lipoxygenase solution (fraction 1) containing indicated amount of enzyme was added to 2.7 cm³ of substrate solution.*

Ultracentrifuge studies

Analyses were made at 20 °C with a Spinco Model E ultracentrifuge equipped with a scanning photometer. Sedimentation velocity studies were run at 67,700 rpm. Sedimentation equilibrium experiments were performed at 7,447 rpm. The concentrations of protein samples were 0.7 mg/cm³ and 0.5 mg/cm³ respectively for fraction 1 and 2 of horse bean lipoxygenase in the equilibrium experiments. In the sedimentation velocity studies it was 2.5 mg/cm³ and 2 mg/cm³ in acetate buffer (100 mM, pH 5.5).

Results

In the purification method of horse bean lipoxygenase developed by BEAUX *et al.* (1973), the last step was ionic exchange chromatography on CM Sephadex C 50. The elution diagram shows two peaks, the first of which was taken as lipo-

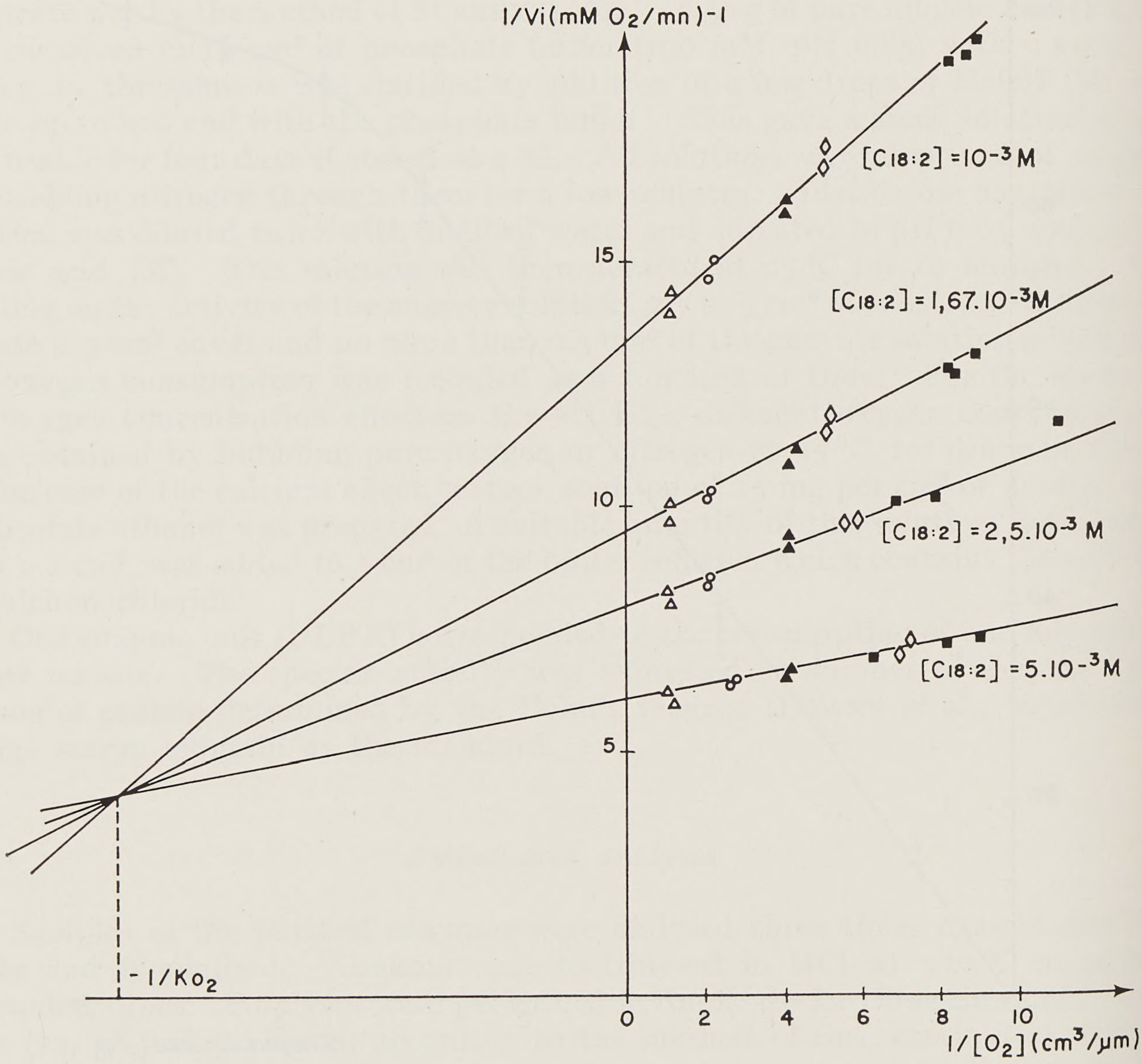


FIG. 2. — *Effect of oxygen concentration on enzyme activity at different linoleic acid concentrations. 0.015 cm³ of a lipoxygenase solution (fraction 1 : 0.5 mg/cm³) was added to 3 cm³ of substrate solution containing indicated amount of linoleic acid.*

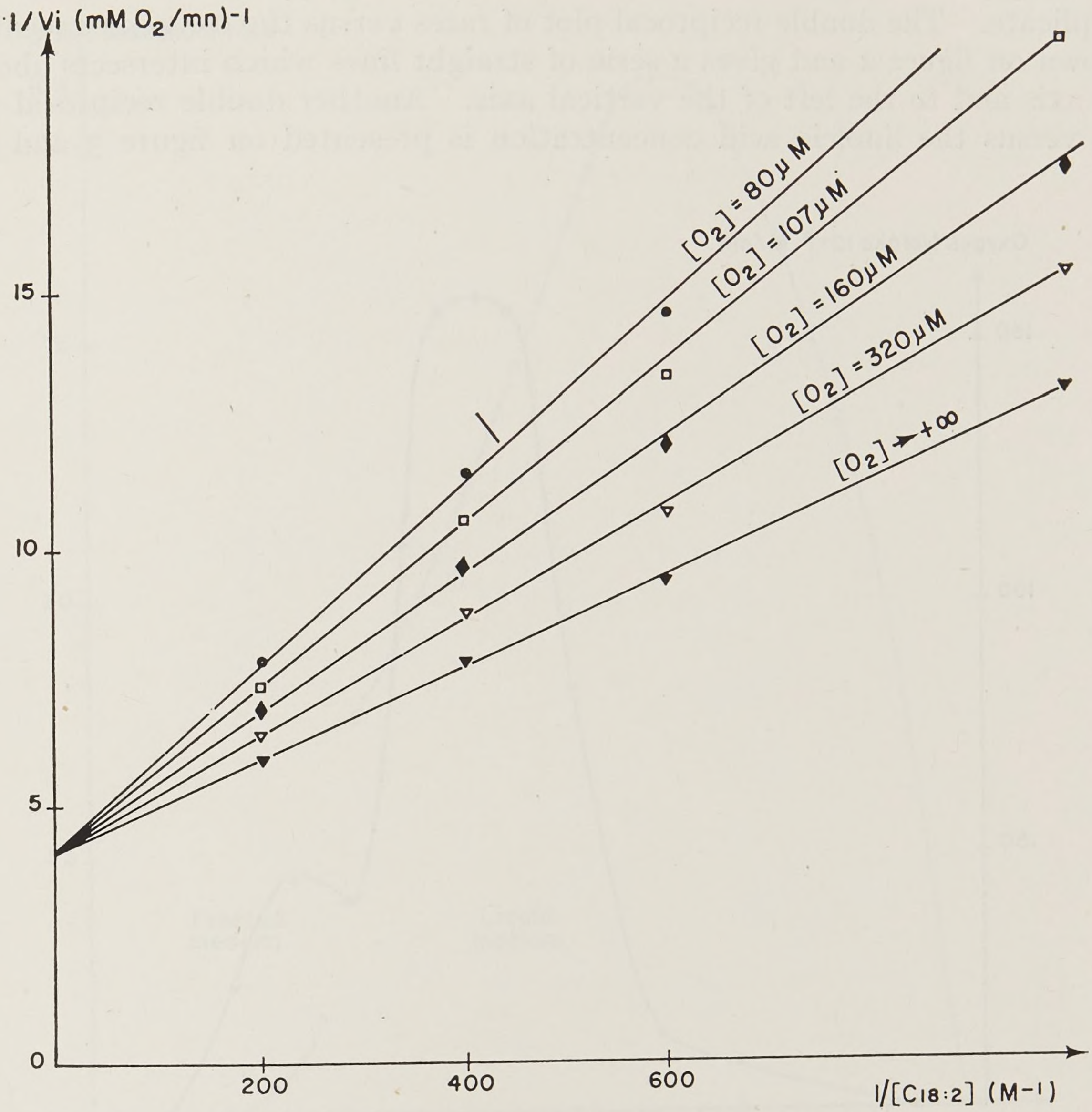


FIG. 3. — *Effect of linoleic acid concentrations on enzyme activity at different oxygen concentrations. Same conditions as in fig. 2.*

xygenase; but, after thorough assays we have shown that the second peak which was present at a lower concentration, contained lipoxygenase activity. We call the first peak fraction 1 and the second one fraction 2. Depending on the fractionation, the relative heights of the two peaks varied, but the second activity never represented more than 20 per cent of fraction 1.

Activity as a function of enzyme concentration

As is shown on figure 1, the rate of oxygen uptake was proportionnal to enzyme amount until the rate reaches 0.1 mM of oxygen per minute; after this limit there was no proportionnality. This value did not change if the concentration of linoleic acid was increased. Fraction 2 gave the same results.

Activity as a function of linoleic acid and oxygen concentrations

The steady states kinetics were studied for the same amount of horse bean lipoxygenase (fraction 1) by varying oxygen concentration at four linoleic acid levels (1 mM; 1.6 mM; 2.5 mM; and 5 mM). All experiments were carried out

in triplicate. The double reciprocal plot of rates versus the oxygen concentration is shown on figure 2 and gives a serie of straight lines which intersects above the $1/O_2$ axis and to the left of the vertical axis. Another double reciprocal plot of rates versus the linoleic acid concentration is presented on figure 3 and gives a

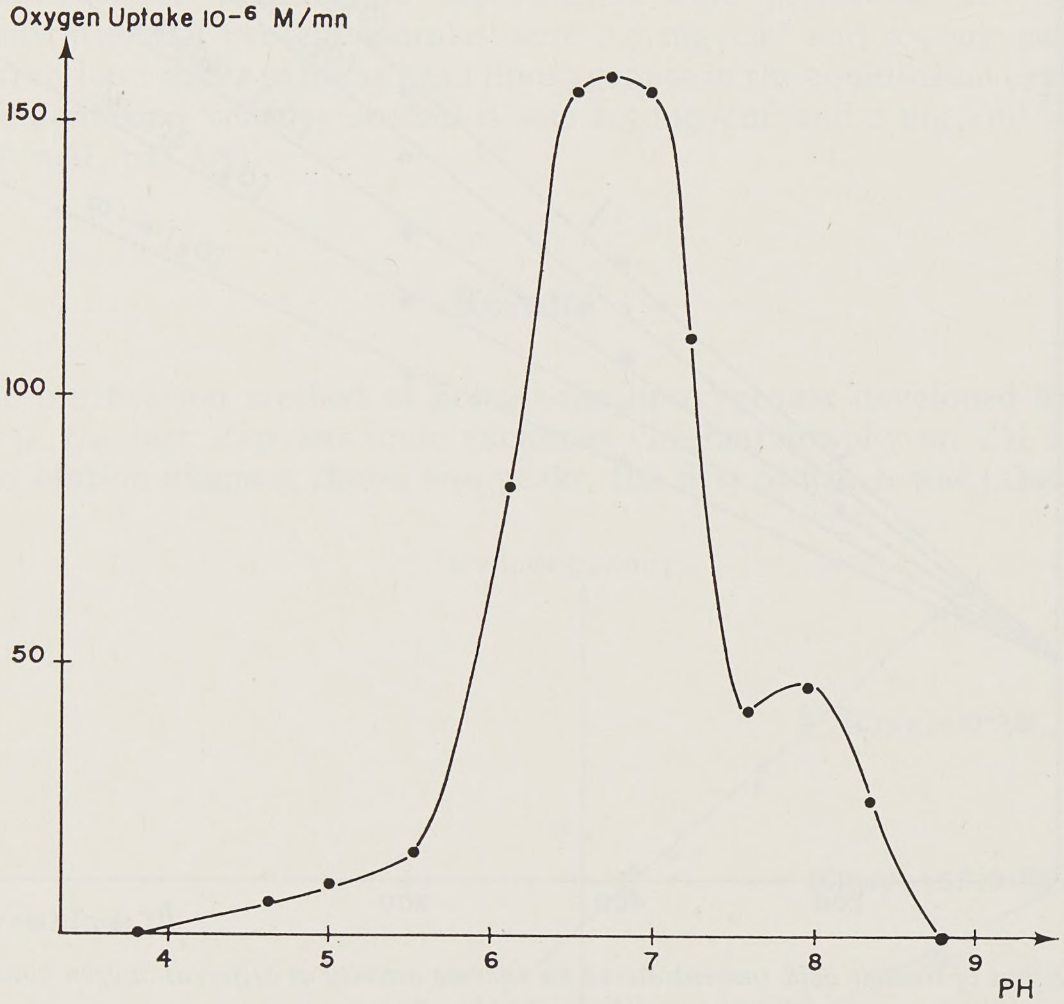


FIG. 4. — *Effect of pH on enzyme activity.* 0.03 *cm³ of a lipoxygenase solution (fraction* 1 *:* 0.15 *mg/cm³) was added to* 3 *cm³ of substrate solution. pH was adjusted by adding NaOH (N) or phosphoric acid (N).*

pattern of intersecting straight lines on the vertical axis. The complete study was not made with fraction 2, but it gave the same results for substrate solutions saturated with air when the linoleic acid concentration was varied in the same proportions.

Activity as a function of pH and temperature

The pH effect is shown on figure 4. The pH activity profile exhibited an optimum near pH 6.8 with a little bump at pH 8. The activity was completely inhibited below pH 5 and above pH 9. On figure 5 is reported the temperature effect. The optimum activity was close to 25 °C. If the horse bean lipoxygenase (fraction 1) was still active below 0 °C, it was inactivated by temperatures above 50 °C. Activation energy between 0° and 20 °C calculated from this curve was 30 Kjoules per mole. The fraction 2 had the same pH and temperature optima.

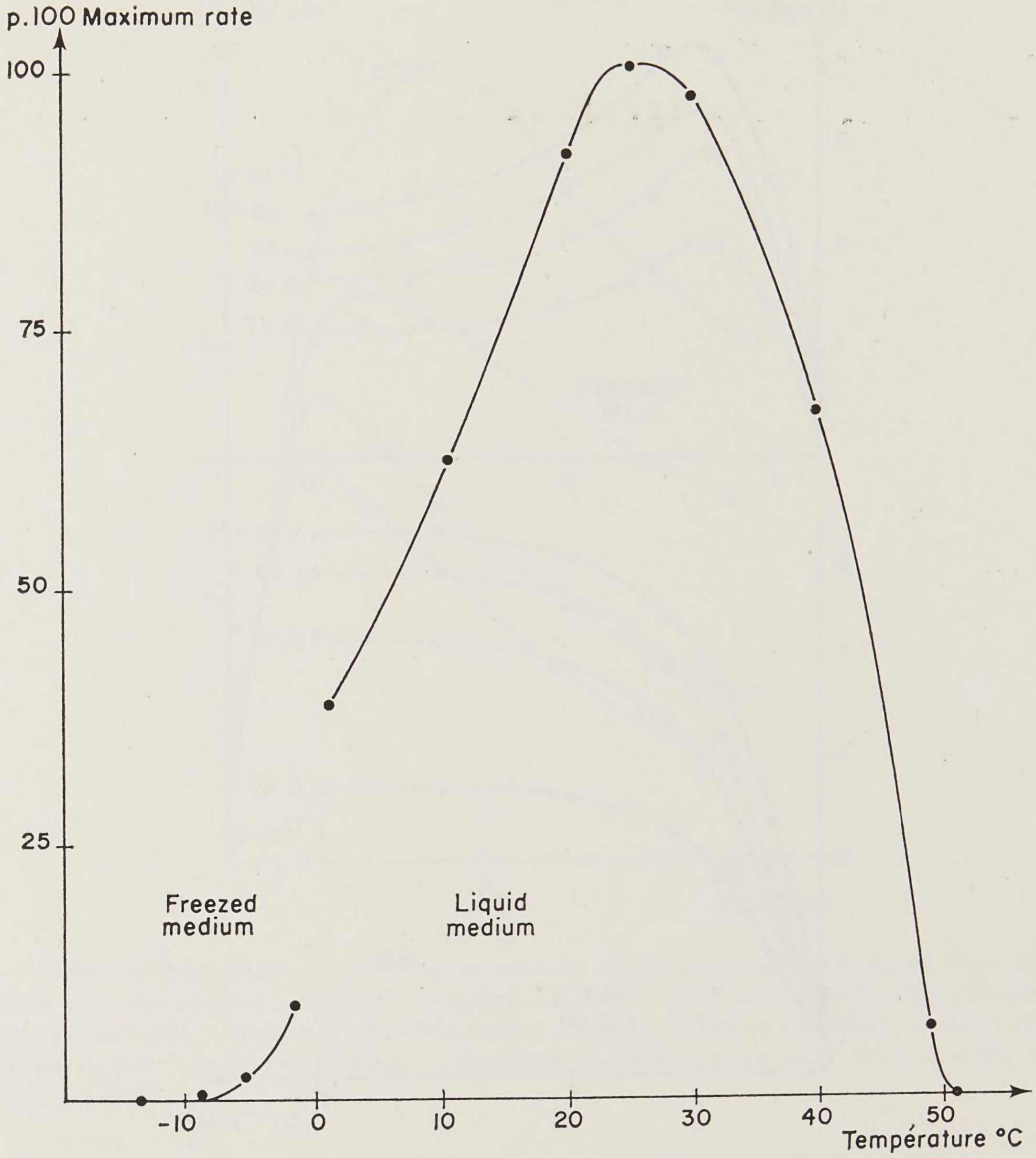


FIG. 5. — *Effect of temperature on enzyme activity.*
The activity was measured according to SURREY (1964) *except that the pH was pH* 6.85.

Activity as a function of calcium concentration

The study of the calcium was made only on fraction 1 in the absence of Tween 20. The effect of increasing concentration of Ca^{++} ($CaCl_2$) on the enzyme activity for two different buffers at pH 7 : phosphate (KH_2PO_4) and morpholinoethane sulfonic acid (M.E.S.) at a same molarity (100 mM) is shown in figure 6. It can be seen (fig. 6 A) that an optimum Ca^{++} concentration existed, the value of which increased slightly with increasing concentrations of linoleic acid. This optimum did not exist with M.E.S. as buffer. We observed an increasing activity until it reached a constant level. Beyond this point enzymatic activity was independent of Ca^{++} (fig. 6 B). In the case of phosphate buffer the optimum Ca^{++} concentration was clearly dependent of molarity of the phosphate buffer (fig. 7). As phosphate molarity increased, optimum concentration of calcium and activity at this optimum decreased whereas without calcium the activity increased slightly.

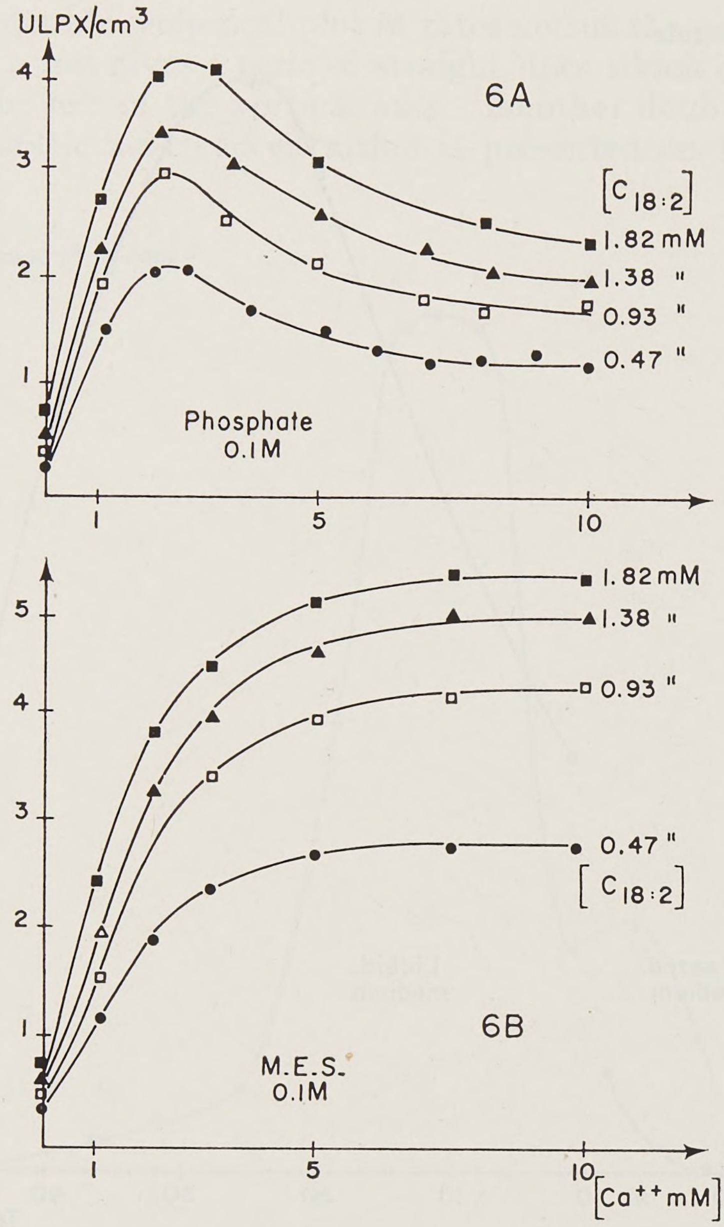


FIG. 6. — *Effect of calcium on activity.* 0.05 *cm³ of a lipoxygenase solution (fraction* 1 : 0.1 *mg/cm³) was added to the buffer solution (*3 *cm³) containing indicated amounts of linoleic acid (added as ethanolic solution) and Ca^{++} (added as $CaCl_2$). Fig. 6A : Buffer is phosphate* 100 *mM, pH* 7. *Fig. 6B : Buffer is M.E.S.* 100 *mM, pH* 7.

Molecular weight determinations

The molecular weights of the two fractions of lipoxygenase were determined by the sedimentation equilibrium technique. The partial specific volumes of each protein were calculated from their amino acid composition (see below) as 0.733 and 0.728 g/cm³ for fraction 1 and 2 respectively. The results were 85,000 for fraction 1 and 66,000 for fraction 2.

Amino acid compositions

Amino acid compositions are given in table 1 in weight per cent and in number of residues using the molecular weight of 85,000 for fraction 1 and 66,000 for fraction 2. The assay of free sulfhydryl groups was only made in the case of fraction 1. With the method of ROHRBACH *et al.* (1973) we obtained 1.95 free SH groups per molecule of protein.

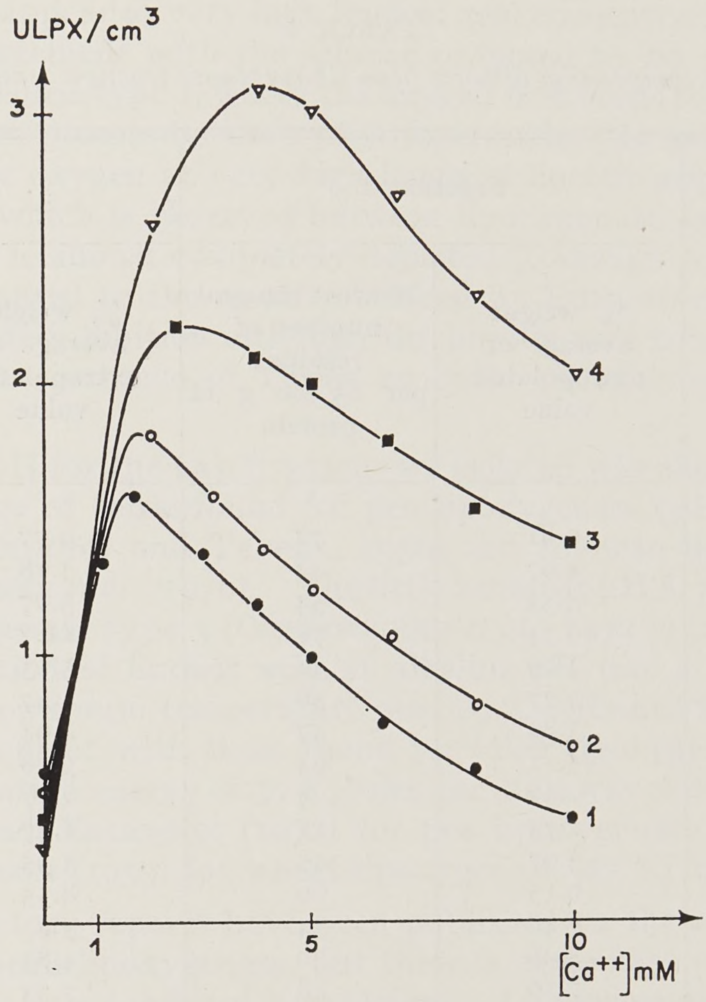


FIG. 7. — *Effect of phosphate molarity on activation of lipoxygenase by calcium ions at pH* 6.85. 0.03 *cm³ of a lipoxygenase solution (fraction* 1 : 0.1 *mg/cm³) was added to the phosphate buffer solution* (3 *cm³*) *pH* 7 *containing linoleic acid* (1.82 *mM, added as ethanolic solution) and indicated amount of* Ca^{++} *(added as* $CaCl_2$*). Phosphate molarity* (1) 300 *mM*, (2) 200 *mM*, (3) 100 *mM and* (4) 50 *mM*.

Iron determination

The result after the chemical assay of iron in fraction 1 was 1.02 atom per mole. This assay was not made on fraction 2.

Discussion

Results which were obtained for the effect of enzyme concentration on activity is in agreement with values given by MITSUDA *et al.* (1967) for soybean lipoxygenase type I. For quantities above 2.5 µg of pure lipoxygenase, oxygen uptake was not proportional to enzyme amount. For horse bean enzyme this limit corresponded to 0.1 mM of oxygen consumed per minute whereas it was 0.2 mM for soybean enzyme. Thus, it appears that the specific activity of soybean lipoxygenase type I at pH 9, was approximately twice as high as that for horse bean at pH 7, at least in the case of linoleic acid. The calculated turnover number was 8 200 Moles of oxygen consumed per minute per mole of enzyme. This value is different from the 15,500 found by CHRISTOPHER *et al.* (1970), for lipoxygenase type I from soybean but is close to the 7 400 found for pea lipoxygenase (SVENSSON and ERIKSSON, 1972) and the 6 500 for lipoxygenase type 2 (CHRISTOPHER *et al.*, 1970).

TABLE I

Amino acid composition of horse bean lipoxygenase fraction 1 and fraction 2

Amino Acid	Fraction 1		Fraction 2	
	% weight average or extrapolated value	Nearest integral number of residues per 85,000 g of protein	% weight average or extrapolated value	Nearest integral number of residues per 66,000 g of protein
Aspartic acid	9.81	72	9.77	56
Threonine ([a])	4.97	42	5.78	38
Serine ([a])	5.53	54	5.87	44
Glutamic acid	10.74	71	11.7	60
Proline	4.99	44	5.13	35
Glycine	3.77	56	4.47	52
Alanine	3.89	47	4.04	38
Valine ([b])	5.12	44	5.08	34
1/2 Cystine ([c])	0.47	4	1.27	8
Methionine ([c])	1.73	11	1.37	7
Isoleucine ([b])	5.97	45	5.55	32
Leucine	9.15	69	8.55	50
Tyrosine ([a])	6.46	34	5.4	22
Phenylalanine	5.26	30	4.83	22
Lysine	7.19	48	7.33	38
Histidine	4.39	27	4.55	22
Arginine	6.96	38	6.95	29
Tryptophan	3.62 ([d])	17	2.46 ([d])	9
	3.41 ([e])	16	2.36 ([e])	8

([a]) Extrapolated values to zero hydrolysis time.
([b]) Average values for 72 hr hydrolyzates only.
([c]) Half-cystine and methionine contents determined as cysteic acid and methionine sulfone after performic acid oxidation (MOORE, 1963).
([d]) Values determined by the method of GAITONDE and DOVEY (1970).
([e]) Values determined by the method of BEAVEN and HOLIDAY (1952).

For each linoleic acid and oxygen concentration tested the kinetics of lipoxygenase activity were of the Michaelian type (fig. 2 and 3). In our conditions we never observed a lag period and the initial rate is the maximum rate. According to EGMOND *et al.* (1976) this means that the initial quantity of hydroperoxides was always sufficient. During the time range that we studied the oxygen uptake, we obtained straight progress curves; thus, the self catalysed destruction of lipoxygenase reported by SMITH and LANDS (1972) is negligible over this time range when the substrate is linoleic acid.

The patterns of double reciprocal plots of the rates versus O_2 and linoleic concentrations show a set of intersecting lines. These results are consistent with an ordered addition of O_2 and linoleic acid; the addition of the first reactant (O_2) is a rapid equilibrium (CLELAND, 1970; SEGEL, 1975). Linoleic acid can add only to the enzyme-O_2 complex and thus displaces the $E + O_2 \rightleftarrows E - O_2$ equilibrium to the right. An infinitely high concentration of linoleic acid (S) can pull all the E to the EO_2S form, regardless of the O_2 level; that is to say, the requirement for

oxygen seems to disappear at very high linoleic acid concentrations. This ordered mechanism is in agreement with the scheme proposed by DE GROOT *et al.* (1975) for soybean lipoxygenase type I, where the oxygen first binds to the ferrous enzyme during the activation process by the 13-hydroperoxide. In another way, the lack of a requirement for oxygen at very high levels of linoleic acid could explain the anaerobic reaction which is observed between lipoxygenase and its reaction products when oxygen is almost completely depleted (GARSSEN *et al.*, 1971; NICOLAS *et al.*, 1974). Compared to the results obtained by EGMOND *et al.* (1976), we did not observe substrate inhibition although the linoleic acid concentration we used was very high. The presence of Tween 20 could probably explain this discrepancy.

The optimum pH for the two fractions we isolated was close to pH 6.8. This value is in the range of those found for pea lipoxygenase (pH 6.9), potato lipoxygenase (pH 6) (SIDDIQI and TAPPEL, 1956) and soybean lipoxygenase type 2 (pH 6.6) (CHRISTOPHER *et al.*, 1970). The little bump at pH 8, previously observed for soybean lipoxygenase type 3 (CHRISTOPHER *et al.*, 1972 *b*), may have been due to better solubilization of linoleic acid at alkaline pH (i.e. a better accessibility for enzyme). The optimum temperature near 25 °C obtained for horse bean lipoxygenase is in agreement with those found for other lipoxygenases. Between 0° and 20 °C, the activation energy of 30 Kjoules per mole was close to values published by SVENSSON and ERIKSSON (1972) for pea lipoxygenase (27 Kj/mole) and IRVINE and ANDERSON (1953) for wheat lipoxygenase (27 Kj/mole).

Some contradictory reports have been published on the effect of calcium on the activity of soybean lipoxygenase, but there is agreement on the following aspects : lipoxygenase 1 is inhibited by calcium. Lipoxygenase 2 is activated by calcium but no optimum calcium concentration was found. However when Tween 20 is present alone, the activity is twice as high as the activity when Tween 20 and calcium are present together. It appears that in the presence of Tween 20, calcium acts as an inhibitor.

In our study, the M.E.S. which is a zwitterionic buffer was chosen because it does not complex divalent cations. In figure 6 A, for a same molarity of phosphate buffer, the optimum concentration of calcium slightly depended on substrate concentration and we did not observe the stoechiometric relationship between calcium and linoleic concentration pointed out by RESTREPO *et al.* (1973). On the other hand, this optimum concentration strongly depends on the phosphate molarity (fig. 7). We have verified that this optimum concentration does not vary with enzyme concentration. Thus, formation of the insoluble salts of calcium phosphate decreases interactions between calcium and linoleic acid which are probably responsible for the increasing activity of lipoxygenase by calcium. If calcium is added after linoleic acid and lipoxygenase have been mixed, there is no activation. This activation only takes place if calcium is added before, or at least at the same time as the enzyme. In the presence of Tween 20 there is no activation but a slight inhibition. These results are in agreement with those obtained by KOCH *et al.* (1971) and ZIMMERMAN and SNYDER (1974) for soybean lipoxygenase.

The two fractions of lipoxygenase do not show essential differences in their amino acid compositions; compared to the one reported by STEVENS *et al.* (1970) there are many similarities. Few differences exist for the basic residues (Lysine, Histidine and Arginine) which, proportionally are present in higher amounts in the horse bean enzymes than in the soybean enzyme. This could explain the

difference in isoelectric points which were higher in the case of horse bean : 5.78 and 5.9 (BEAUX *et al.*, 1973) than in soybean : 5.65 (CATSIMPOOLAS, 1969).

One atom of iron has been determined in the horse bean lipoxygenase fraction 1 consequently, the horse bean enzyme has the same characteristic as the three types of soybean lipoxygenase (CHAN, 1973; ROZA and FRANCKE, 1973; PISTORIUS and AXELROD, 1974).

The 85,000 molecular weight for fraction 1 measured by sedimentation equilibrium is in accord with that obtained by analytical gel filtration on Sephadex G 150 (BEAUX *et al.*, 1973). For fraction 2 ultracentrifugation gives 66,000 molecular weight. These values are smaller than those published for soybean lipoxygenase (MITSUDA *et al.*, 1967; STEVENS *et al.*, 1970; CHRISTOPHER *et al.* 1972 b), but are close to those found by ERIKSSON and SVENSSON (1970) for pea lipoxygenase.

The two fractions we have isolated from horse bean flour show very similar specific activity (per mg of protein), substrate specificity, pH and temperature optima and amino acid compositions. The only differences are in their molecular weights and their behaviour on the ionic exchanger CM Sephadex C 50. Electrophoresis in acid and basic media and isoelectrofocusing in polyacrylamide gels, always gave the same patterns for the two fractions. These results may be explained by fraction 2 originating from the partial dissociation of fraction 1.

Reçu pour publication en mai 1977.

Acknowledgements

We are indebted for the ultracentrifugation experiments to M. PERNOLLET (Laboratoire de Biochimie Physique de l'I.N.R.A., Centre d'Orsay, 91405 Orsay, France).

Résumé

Quelques caractéristiques physicochimiques de la lipoxygenase de la fève (Vicia faba L.)

Deux fractions 1 et 2 de la lipoxygénase (EC.1.13.11.12) ont été purifiées à partir de la fève (Vicia faba L.). La fraction 1, quantitativement la plus importante a été étudiée le plus en détail. L'étude des cinétiques à l'état stationnaire montre que la fixation des substrats se fait suivant un mécanisme ordonné, dans lequel l'oxygène se fixe avant l'acide linoléique. Le pH optimum est voisin de 6,8, la température optimum est proche de 25 °C, pour les 2 fractions isolées. En absence de Tween 20 dans le milieu réactionnel, le calcium est un activateur pour la lipoxygénase à pH 7. Cependant avec un tampon phosphate, il existe un optimum de concentration en calcium qui dépend fortement de la molarité du tampon. Cet optimum n'existe pas avec un tampon M.E.S.

Les compositions en acides aminés des 2 fractions ne présentent pas de différences essentielles. La présence d'un atome de fer par mole d'enzyme a été mise en évidence dans la fraction 1. Les poids moléculaires déterminés par ultracentrifugation sont respectivement de 85 000 et 66 000 pour les fractions 1 et 2.

Mots clés : féverole fourragère, lipoxygénase.

Références

BEAUX Y., DRAPRON R., NICOLAS J. and CAILLAT J. M., 1973. La lipoxygénase de la fève (*Vicia faba L.*). I. — Isolement. *Biochimie*, **55**, 253-262.

BEAVEN G. H. and HOLIDAY E. R., 1952. Ultraviolet Absorption Spectra of Proteins and Amino Acids. *Adv. Prot. Chem.*, vol. 7, 319-386.

CATSIMPOOLAS N., 1969. Isolation of soybean lipoxidase by isoelectric focusing. *Arch. Biochem. Biophys.*, **131**, 185-190.

CHAN H. W. S., 1973. Soya-bean lipoxygenase: an iron containing dioxygenase. *Biochim. Biophys. Acta*, **327**, 32-35.

CHRISTOPHER J. P., PISTORIUS E. K. and AXELROD B., 1970. Isolation of an isozyme of soybean lipoxygenase. *Biochim. Biophys. Acta*, **198**, 12-19.

CHRISTOPHER J. P., PISTORIUS E. K., REGNIER F. E. and AXELROD B., 1972a. Factors influencing the positionnal specificity of soybean lipoxygenase. *Biochim. Biophys. Acta*, **289**, 82-87.

CHRISTOPHER J. P., PISTORIUS E. K. and AXELROD B., 1972b. *Biochim. Biophys. Acta*, **284**, 54-62.

CLELAND W. W., 1970. In BOYER P. D., The Enzymes (3rd Edition), vol. **2**, 1-65, *Academic Press*, New York.

DE GROOT J. J. M. C., VELDINK G. A., VLIEGENTHART J. F. G., BOLDINGH J., WEVER R. and VAN GELDER B. F., 1975. Demonstration by EPR spectroscopy of the functional role of iron in soybean lipoxygenase-I. *Biochim. Biophys. Acta*, **377**, 71-79.

DRAPRON R., BEAUX Y., CORMIER M., GEFFROY J. and ADRIAN J., 1974. Répercussions de l'action de la lipoxygénase en panification. Destruction des acides gras essentiels à l'état libre, des caroténoïdes et des tocophérols. Altération du goût du pain. *Ann. Technol. agric.*, **22**, 353-365.

EGMOND M. R., BRUNORI M. and FASELLA P. M., 1976. The steady-state kinetics of the oxygenation of linoleic acid catalysed by soybean lipoxygenase. *Eur. J. Biochem.*, **61**, 93-100.

ERIKSSON C. E. and SVENSSON S. G., 1970. Lipoxygenase from peas, purification and properties of the enzyme. *Biochim. Biophys. Acta*, **198**, 449-459.

GAITONDE M. K. and DOVEY T., 1970. A rapid and direct method for the quantitative determination of tryptophan in the intact protein. *Biochem. J.*, **117**, 907-911.

GARSSEN G. J., VLIEGENTHART J. F. G. and BOLDINGH J., 1971. An anaerobic reaction between lipoxygenase, linoleic acid and its hydroperoxides. *Biochem. J.*, **122**, 327-332.

HAMBERG M., 1971. Steric analysis of hydroperoxides formed by lipoxygenase oxygenation of linoleic acid. *Anal. Biochem.*, **43**, 515-526.

IRVINE G. N. and ANDERSON J. A., 1953. Kinetic studies of the lipoxidase system in wheat. *Cereal Chem.*, **30**, 247-255.

KOCH R. B., BRUMFIEL B. L. and BRUMFIEL M. N., 1971. Calcium requirement for lipoxygenase catalyzed linoleate oxidation. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **48**, 532-538.

LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L. and RANDALL R. J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.

MITSUDA H., YASUMOTO K., YAMAMOTO A. and KUSANO T., 1967. Study on soybean lipoxygenase I. — Preparation of cristalline enzyme and assay by polarographic method. *Agric. Biol. Chem.*, **31**, 115-118.

MOORE S., 1963. On the determination of cystine as cysteic acid. *J. Biol. Chem.*, **238**, 235-237.

NICOLAS L., BEAUX Y. and DRAPRON R., 1974. Les méthodes de mesure de l'activité lipoxygénasique. Mise au point d'une nouvelle méthode. *Ann. Technol. Agric.*, **23**, 287-308.

PISTORIUS E. K. and AXELROD B., 1974. Iron, an essential component of lipoxygenase. *J. Biol. Chem.*, **249**, 3183-3186.

RESTREPO F., SNYDER H. E. and ZIMMERMAN G. L., 1973. Calcium activation of soybean lipoxygenase. *J. Food Sci.*, **38**, 779-782.

ROHRBACH M. S., HUMPHRIES B. A., YOST Jr F. J., RHODES W. G., BOATMAN S., HISKEY R. G. and HARRISON J. H., 1973. The reaction of 4.4′-bis-dimethylaminodiphenylcarbinol with the sulfhydryl group. A new reagent for sulfhydryl analysis. *Anal. Biochem.*, **52**, 127-142.

ROZA M. and FRANCKE A., 1973. Soyabean lipoxygenase: an iron-containing enzyme. *Biochim. Biophys. Acta*, **327**, 24-31.

SEGEL I. H., 1975. Enzyme kinetics. Behaviour and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems, 320-329, J. WILEY and Sons, New York.

SIDDIQI A. M. and TAPPEL A. L., 1956. Catalysis of linoleate oxidation by pea lipoxidase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **60**, 91-99.

SMITH W. L. and LANDS W. E. M., 1972. Oxygenation of unsaturated fatty acids by soybean lipoxygenase. *J. Biol. Chem.*, **247**, 1038-1047.

Spackman D. H., Stein W. H. and Moore S., 1958. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Anal. Chem.*, **30**, 1190-1206.

Stevens F. C., Brown D. M. and Smith E. L., 1970. Some properties of soybean lipoxygenase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **136**, 413-421.

Surrey K., 1964. Spectrophotometric method for determination of lipoxidase activity. *Plant Physiol.*, **39**, 65-70.

Svensson S. G. and Eriksson C. E., 1972. Thermal inactivation of lipoxygenase from peas. I Time-temperature relationships and pH dependance. *Lebensm. Wissen. u Technol.*, **5**, 118-123.

Zimmerman G. L. and Snyder H. E., 1974. Role of calcium in activating soybean lipoxygenase 2. *Agric. Food Chem.*, **22**, 802-805.

Ann. Technol. agric., 1977, **26** (2), 133-137.

Bleaching of carotenoid by the enzyme lipoxygenase (*)

W. GROSCH, F. WEBER, K. H. FISCHER

Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie
D 8046 Garching, Deutsche Bundesrepublik

Summary

A partially purified soybean lipoxygenase (L-3) was incubated at pH 6,5 with linoleic acid and oxygen. Systems with and without the polyene glycoside crocin were compared. The steric analysis of the linoleic acid hydroperoxydes (LOOH) demonstrates that the enzyme produce mainly the L-configuration of the 13-isomer and a racemic mixture of the 9-isomer. Crocin changes the ratio of the enantiomers. More 13L-LOOH is formed and the proportion of the 9L/9D-LOOH mixture decreases.

Co-oxidation experiments were also carried out with β-carotene. The volatile products which arise from the breakdown of this polyene were identified. Their formation was studied in relation to the incubation time.

Key-Words: Soybean Lipoxygenase carotenoïds.

Two types of lipoxygenase occur in leguminosae; these differ not only in optimum pH values, in substrate and peroxidation specificity but also in carotene bleaching activity. In soya beans the type 1 lipoxygenase with an optimum pH of 9 possesses a low carotenoid bleaching activity. In contrast the type 2 lipoxygenases with an optimum pH of 6.5 can co-oxidise polyenes with a high velocity in the presence of linoleic acid and oxygen.

To get an insight into the reaction pathway of co-oxidation we have compared the amount and structure of hydroperoxides which arise from linoleic acid in the presence and absence of the carotenoid crocin. The substrate mixtures were incubated with a partially purified type 2 soya lipoxygenase. The enzyme is designated as L-3 because its position in the eluate of DEAE-cellulose-chromatography agrees with the results of the Axelrod-group.

On the left side of fig. 1 you see the two reaction systems tabulated. In

(*) Présenté au Symposium International I.S.F., « Lipases et lipoxygénases d'origine végétale », Marseille, 30 août-4 septembre 1976.

LOOH formed from Linoleic Acid with Soybean Lipoxygenase L-3

	Reaction - System (180 ml)	% conversion into LOOH	13 : 9	13L : 13D : 9L : 9D
I.	L-3 (75 units), linoleic acid (192 µmol), Tween 80 (7.5 µl), 0.05 M - sodium phosphate buffer (pH 6.5)	39	54 : 46	43 : 11 : 21 : 25
II.	As I. but with crocin (150 µmol)	55	75 : 25	64 : 11 : 11 : 14

T : 15°C; incubation time : 15 min

FIG. 1. — *Looh formed from Linoleic Acid with Soybean Lipoxygenase L-3.*

Incubation of ß-Carotene, Linoleic Acid and L-3. GC-Analysis of the Volatile Compounds.

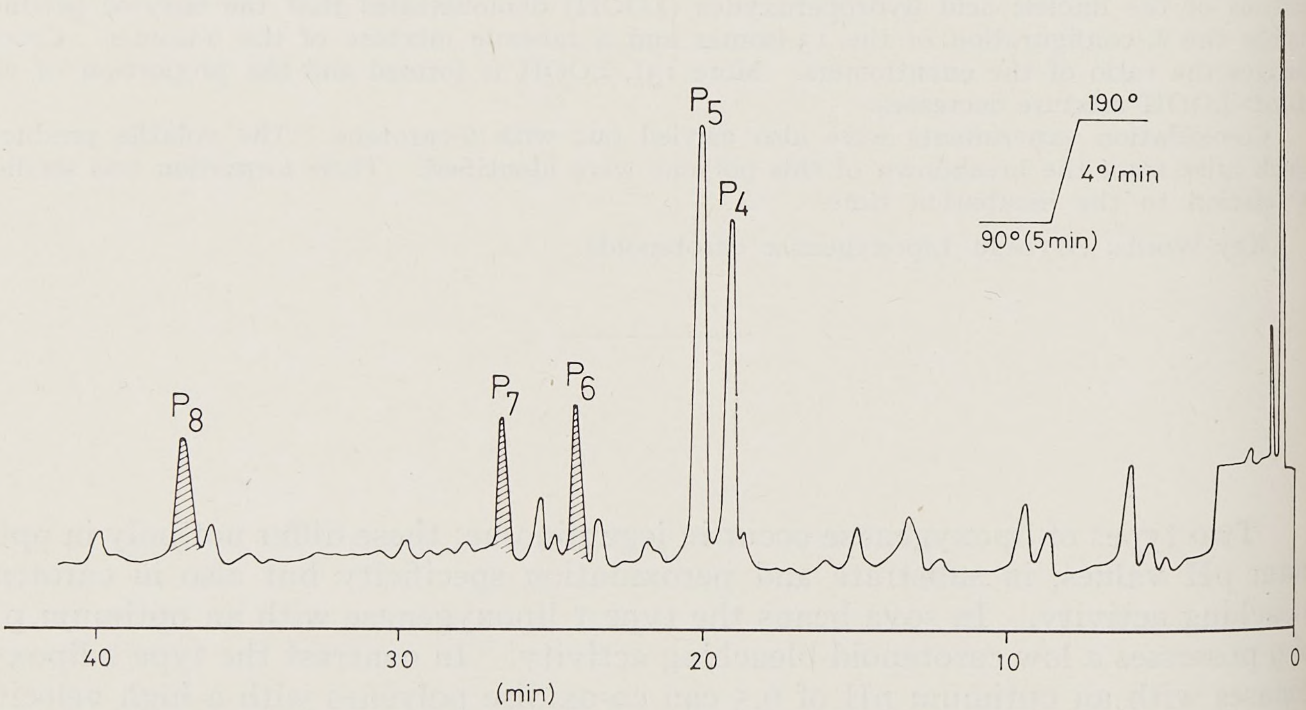


FIG. 2. — *Incubation of* ß*-Carotene, Linoleic Acid and L-3. GC-Analysis of the Volatile Compounds*

Experiment I the crocin is omitted. A comparison of Experiments I and II shows that during co-oxidation of crocin significant more LOOH arises, compared with the amount formed in the absence of crocin. The right side of the figure shows the peroxidation specificity, which is changed in the presence of crocin. More 13-hydroperoxide is formed and the ratio 13- to 9-isomer increased from 54 : 46 to 75 : 25. Steric analysis by the method of Hamberg demonstrates, in Experiment I, that the lipoxygenase produces mainly the L-configuration of the 13-isomer and a racemic mixture of the 9-isomer. Crocin changes the ratio of the

enantiomers. More 13L-LOOH (64 %) are formed and the portion of the 9L/9D-mixture decreases.

The products which are formed from the carotenoids by co-oxidation are of interest. First of all we analysed the volatile compounds which arise from the bleaching of β-carotene.

After an incubation of 3 minutes at 15 °C the reaction products were extracted and gaschromatographically analysed. Besides the volatile compounds that arise from linoleic acid three compounds P6, P7 and P8 appear (fig. 2). They are only detected in experiments with β-carotene and the enzyme L-3.

Results of the Indentification Experiments

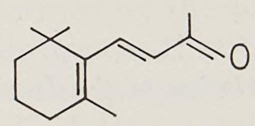
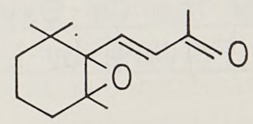
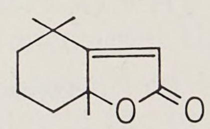
Compound in GC	Structure	Precursor
P4 P5	two geometric isomers of 2.4-decadienal	linoleic acid
P6		β-carotene
P7		"
P8		"

FIG. 3. — *Results of Indentification Experiments.*

From gaschromatographic and mass spectrometric data the peaks were identified as tabulated in the next slide (fig. 3).

Peaks 4 and 5 are two geometric isomers of 2.4-decadienal; these volatile aldehydes arise from the oxidation of linoleic acid. P6 is identical with β-ionone, P7 with β-ionone epoxide and P8 was identified as dihydroactinidiolide. β-ionone and the dihydroactinidiolide are interesting flavour substances of some plant foods like tomatoes and tea.

In further experiments the incubation time was varied, comparison being made between reaction times of 2 and 4 minutes.

The left side of figure 4 shows a cutting from a gas chromatogram of the volatile compounds after 2 minutes of incubation. Part of the emulsified β-carotene but not all is broken down. You can see that the volatile breakdown products of β-carotene predominate. Only a very small peak of the volatile oxidation product of linoleic acid, 2.4-decadienal, is visible. It is also of interest that all 3 breakdown products of the β-carotene are formed in about the same ratio, although in smaller quantity, when an even shorter incubation time is used or the

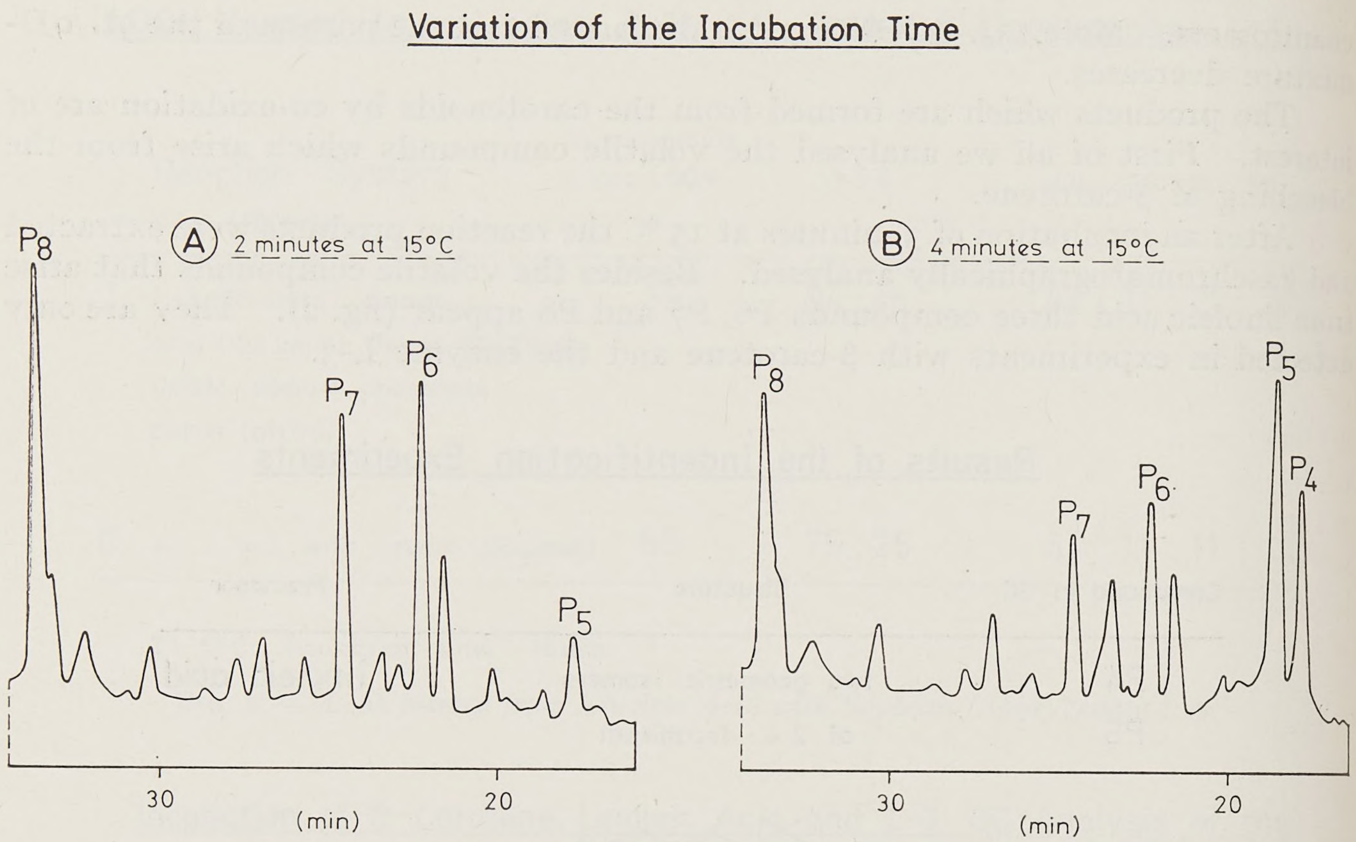


FIG. 4. — *Variation of the Incubation Time.*

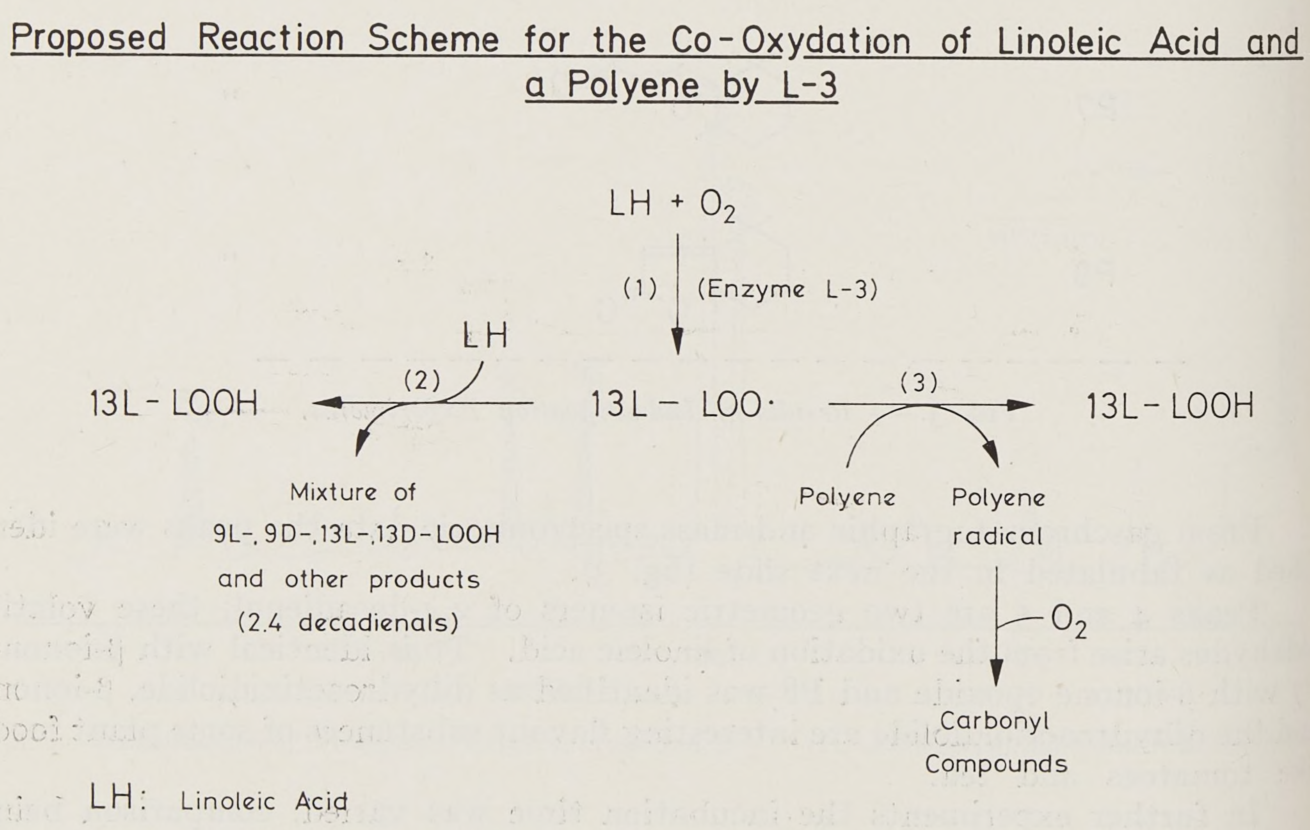


FIG. 5. — *Proposed Reaction Scheme for the Co-Oxydation of Linoleic Acid and a Polyene by L-3.*

enzyme concentration is lowered. The three compounds appear to be formed simultaneously.

The right side of the figure shows the volatile reaction products after an incubation time of 4 minutes. This time is longer than we need for a complete destruction of the β-carotene. We have measured that under the conditions chosen after 3

minutes the β-carotene is already completely consumed by the co-oxidation process. In the chromatogram you see a fairly high concentration of the 2.4-decadienal as well as of the volatile compounds from β-carotene.

The difference in the reaction products after 2 and 4 minutes indicates that first the β-carotene, and than the linoleic acid, are co-oxidised.

The results reported here concerning the co-oxidation of crocin and of β-carotene can be interpreted as follows (fig. 5).

In the first step of lipoxygenase catalysis 13L-Peroxyl radicals are stereospecifically formed from linoleic acid and oxygen. As explanation of the differences in products which arise from the linoleic acid in the presence and absence of a polyene, we suggest that a large proportion of the peroxyl radicals is not directly converted by the enzyme to linoleic acid hydroperoxides. Therefore these radicals can contact further fatty acid molecules. As is known for the autoxidation process, they may abstract labile hydrogen atoms, which are activated when in the neighbourhood of double bonds. From linoleic acid, radicals will be formed that react unselectively with oxygen (Step 2). Besides the 13-L-LOOH, a mixture of LOOH enantiomers and other oxidation products are formed.

L-3 can however co-oxidise not only unsaturated fatty acids but also other compounds with labile hydrogen atoms such as, in our case, the polyene crocin or β-carotene. It is therefore possible that the polyene competes with linoleic acid for the 13L-peroxyl radical formed by the active site of the enzyme. We believe step 3 competes with step 2. We suppose that these peroxyl radicals preferentially abstract a hydrogen atom from the polyene. This results in 13L-linoleic acid hydroperoxide and a polyene radical that combines with oxygen to produce carbonyl compounds such as β-ionone from β-carotene. Because less linoleic acid is co-oxidised in the presence of a polyene, the proportion of 13L-LOOH in the products arising from linoleic acid is significantly higher.

This reaction scheme leaves some questions open, in particular the way in which the enzyme is regenerated.

Another problem: We have measured that equal amounts of linoleic acid are consumed in the presence and absence of the carotenoid crocin. Therefore we have to assume that step 1 is faster in the presence of crocin *or* the self-destruction of the enzyme is smaller in the presence of the carotenoid.

Reçu pour publication en mai 1977.

Résumé

Décoloration des carotenoïdes par la lipoxygénase

La lipoxygénase du soja (L-3) partiellement purifiée a été incubée à pH 6,5 avec de l'acide linoléique en présence d'oxygène. Les milieux avec et sans crocine (glycoside polyénique) ont été comparés. L'analyse structurale des hydroperoxydes de l'acide linoléique (LOOH) démontre que l'enzyme produit principalement l'isomère 13, de configuration L et un mélange racémique de l'isomère 9. La présence de crocine provoque une modification du rapport des enantiomères. L'augmentation du 13L-LOOH entraîne une diminution du rapport 9L/9D-LOOH.

Des expériences de co-oxydation ont été faites avec du β-carotène. Les produits volatils résultant de la scission de ce polyène ont été identifiés. Leur formation a été étudiée en fonction du temps d'incubation.

Mots clés : Soja, caroténoïdes.

Ann. Technol. agric., 1977, **26** (2), 139-149.

A study of lipoxygenase from lentils and lupins (*)

ESKIN*, N. A. M. and HENDERSON**, H. M.

* *Department of Foods and Nutrition*
** *Department of Food Science, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba. R3T 2N2. Canada*

Summary

Lipoxygenase was partially purified from lentils by ammonium sulfate fractionation and gel filtration on Sephadex G-200, and further characterized by disc gel electrophoresis, isoelectric focussing and molecular weight determination in the presence of sodium dodecyl sulfate. The enzyme was shown to possess a pH optimum of 6.3 and was inactivated by exposure to 70 °C for 15 minutes. The Km value for linoleic acid was calculated to be 2.8 mM. Ammonium sulfate fractionation yielded two highly active preparations which were both active towards linoleic acid and linolenic acids. The isoelectric point was pH 5.3 and electrophoresis at pH 9.3 revealed major lipoxygenase bands at Rf 0.07, 0.17 and 0.32. Molecular weight determination gave a value of 110,000. Preliminary studies on lupins also indicated two active lipoxygenase preparations obtained from ammonium sulfate fractionation. The activity of lipoxygenase in lupins was approximately one sixth of that in lentils. Analysis of the fatty acid content of lentils and lupins showed that C18:2 and C18:3 accounted for 44 per cent and 12 per cent of the total fatty acids in lentils and 20 per cent and 9 per cent of the total fatty acids in lupins. While the levels of these two fatty acids are lower in lupins, the fat content is 13 per cent compared to 2 per cent on a dry basis for lentils. These fatty acids are extremely susceptible to oxidation and while lentils have been reported to become rancid very soon after mechanical disruption of the tissues, a similar problem might be anticipated for lupins involving lipoxygenase.

Key-Words: Lentils, lupins, lipoxygenase.

Introduction

The dramatic rise in the price of soybeans and other protein sources has pointed out the need for Western Canadian farmers to produce more of their own protein crops. In addition to fababeans, lupins and lentils are also being tested in the hope that they will prove suitable for the growing conditions of Western Canada.

(*) Présenté au Symposium International I.S.F., « Lipases et lipoxygénases d'origine végétale », Marseille, 30 août-4 septembre 1976.

Lentils are botanically classified as the genus Ervum (Lentil), sub-family of vetches (Vicieae), family Papilionaceae, order *Leguminosae*. Proximate analysis of lentils indicates an average composition of 26-28 per cent protein and 2 per cent fat on a dry basis. Lupins also belong to the *Leguminosae* family. Of the lupin species and varieties studied at the University of Manitoba, *Lupinus albus* was found to perform substantially better with respect to highest yield per acre. Proximate analysis indicated the protein to be 34-36 per cent and fat 10 per cent on a dry basis (FURGAL, 1974).

Analysis of the fatty acid content of lentils and lupins in our laboratory indicated that linoleic and linolenic acids accounted for 44 per cent and 12 per cent respectively of the total fatty acids in lentils, and 20 per cent and 9 per cent of the total fatty acids in lupins. While the levels of these two fatty acids are lower in lupins one should bear in mind that the fat content is 5-6 times greater. These fatty acids are extremely susceptible to oxidation which is responsible for the development of rancid off-flavors. Processed lentils have been reported to become rancid very soon after mechanical disruption of the tissues (KON *et al.*, 1970) and a similar problem might be anticipated for lupins.

The purpose of this investigation is to study the mechanism of rancidity development in processed lentils and lupins with respect to the enzyme lipoxygenase (linoleate: O_2 oxidoreductase, EC.1.13.1.13). This enzyme catalyses the oxidation, in the presence of molecular oxygen, of *cis, cis*-1, 4-pentadiene systems in unsaturated fatty acids to conjugated *cis, trans*-hydroperoxides. It has been extensively studied in a number of plants including soybeans (CHRISTOPHER *et al.*, 1970; RESTREPO *et al.*, 1973), peas (ERIKSSON and SVENSSON, 1970; ARENS *et al.*, 1973; HAYDAR and HADZIYEV, 1973), alfalfa (BEN-AZIZ *et al.*, 1971) and fatabeans (ESKIN and HENDERSON, 1974, 1976; BEAUX and DRAPRON, 1974). Lipoxygenase was reported in lentils by BLAIN and co-workers (1959) and a fat oxidase was observed in *Lupinus albus* by CRAIG almost 40 years ago (1937). However the presence of isoenzymes in either of these legumes has not been reported.

This study reports the partial purification of the enzyme from lentils and lupins and an investigation of some of its properties.

Experimental

Source Material

Lentils and lupins were provided by the Department of Plant Science, University of Manitoba. They were harvested in 1975 and subsequently stored at room temperature. These varieties are foreign introductions into Canada, principally from Europe, and are currently under agronomic evaluation (FURGAL, 1974).

Enzyme assays

All lipoxygenase assays measured oxygen uptake with a polarographic oxygen electrode, at 25 °C, employing a YSI model 53 biological oxygen monitor (Yellow Springs Instrument Co., Yellow Springs, Ohio, U.S.A.). 3.0 ml of 4.0 mM linoleic acid dispersed with 0.028 per cent Tween-20 in phosphate buffer (KH_2PO_4), 0.1 M, pH 6.5 /6.3 was placed in the reaction chamber and was oxygenated at 25 °C, for

1.25 min. Enzyme preparations (5-30 μl) was added and the oxygen uptake was continuously recorded on a Honeywell Electronik 19 Recorder, 0-100 mV full scale. The specific activity was calculated as mM oxygen uptake/minute/mg protein. At zero time all substrate solutions were 100 per cent saturated with oxygen. At 25 °C, the concentration of oxygen in a 100 per cent oxygen-saturated aqueous solution is 1.26 mM (YAMAGUCHI *et al.*, 1969). Control experiments with boiled enzyme preparations did not exhibit any activity.

Protein determination

Protein was determined by the method of LOWRY *et al.* (1951) using crystalline bovine serum albumin (British Drug Houses, fraction V) as the standard, or by ultraviolet absorption at 280 nm using an ISCO model UA-4 absorbance monitor.

Fatty acids and glycerides

These were all purchased from Nu-Check, Minneapolis. Solutions were made up fresh daily and were stored under nitrogen in the refrigerator when not in use.

Partial purification

Lipoxygenase was partially purified from buffered crude extracts, containing 1.25 per cent Triton X-100 (PINSKY *et al.*, 1973), of whole lentil (Denjasta L89) and *Lupinus albus* (Blanca) acetone powder by ammonium sulfate fractionation.

The fraction obtained from the 40-50 per cent ammonium sulfate saturation of lentil lipoxygenase was dialysed overnight at 3-4 °C against 2 liters of phosphate buffer, 0.01 M, pH 6.3. The slight precipitate formed was removed by centrifugation. The supernatant was further purified by gel filtration on Sephadex G-200 column at 4 °C. The column dimensions were 50 cm × 2 cm and the eluent (phosphate buffer, 0.01 M; pH 6.3) applied to the column continuously. The elution flow rate was 20 ml/hr and the protein in the effluent monitored at 280 nm. The effluent was collected in 5.0 ml fractions for the determination of activity.

Dix gel electrophoresis on polyacrylamide gel

Electrophoresis was carried out according to the procedure of DAVIS (1964) with an anionic gel system (7.5 % polyacrylamide gel, pH 9.3) described in the Polyanalyst Electrophoresis Apparatus manual published by BUCHLER Instruments, Inc., Fort Lee, New Jersey, U.S.A. In all instances the separating gels were modified by incorporation of 1 per cent (final concentration) of soluble starch. The gels were further modified by doubling the concentration of riboflavin and of ammonium persulfate. Electrophoresis was at 4 °C at 2.4 mA/tube for 2.5 hours. The amount of sample applied to each gel was 50-200 μg protein in the case of the partially purified extracts, but relatively large amounts of crude extract (500 μg) had to be applied.

Detection of lipoxygenase and protein band patterns

The presence of lipoxygenase was determined by the starch-iodine staining method of Guss *et al.* (1967). Total protein was determined by immersion in amido black for 1 hour, followed by electrophoretic destaining.

Isoelectric focussing

This was carried out, according to the procedure of Wrigley (1968), in 7.5 per cent polyacrylamide gel, over a pH range 3-10 employing LKB Ampholine carrier ampholyte no. 8141 (LKB Produkter AB, Bromma, Sweden). The enzyme sample (100 μg protein) and 1 per cent (final concentration) soluble starch were incorporated into the gel mixture prior to photopolymerisation.

Molecular weight determination

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis was performed according to Dunker and Rueckert (1969).

Results

Effect of variety on enzyme activity

Lipoxygenase activity was determined in crude extracts from acetone powders of each of 2 lentil varieties and 4 *Lupinus albus* varieties. The results are shown in Table 1.

TABLE 1

Effect of variety of lentil and lupin lipoxygenase activity

Variety	Specific activity (mmO_2 /min /mg protein)
Lentil:	
401004	0.2520
L89 (Denjasta)	0.3800
Lupinus albus:	
2P196	0.0731
L130	0.0630
L8	0.0660
Blanca	0.0560

The standard reaction mixture composition was: linoleic acid, 4.0 mM, in phosphate buffer, 0.1 M, pH 6.3 (for lupin) and pH 6.5 (for lentil), 3.0 ml; crude extract, 30 μl. The substrate solution was oxygenated at 25 °C for 1.25 min., immediately prior to the addition of the enzyme. Oxygen uptake was monitored at 25 °C using an oxygen electrode.

The higher activity was exhibited by both lentil varieties of which Denjasta was the most active and of the Lupin varieties, 2P196 was the most active. It is apparent that the activity of lipoxygenase in lupins is approximately one-sixth of that found in lentils. Nevertheless the large amount of fat associated with these legumes poses a potential problem with respect to lipoxygenase.

Temperature and pH stability

Lentil lipoxygenase was active over approximately 1.5 units with an optimum pH at 6.3; it was completely inactivated at pH 8.0. Lupin lipoxygenase was also active over approximately 1.5 pH units with an optimum at 6.5. Both these enzymes were completely inactivated by exposure to 70 °C for 15minutes. Both enzymes conformed to the Michaelis-Menten equation and a Lineweaver-Burk plot gave Km values for linoleic acid of 2.8 mM and 5.9 mM for lentil and lupin lipoxygenase respectively.

Partial purification

Lipoxygenase activity was observed in the two fractions obtained from 30-40 per cent and 40-50 per cent ammonium sulfate precipitation for both lentils and lupins. As can be seen in Table 2 there was a 3.5-fold and 2.5-fold purification for each ammonium sulfate fraction from lentils prior to dialysis.

TABLE 2

Yields and enrichment of lentil lipoxygenase at various stages of purification

Procedure	Vol (ml)	Total units	Protein (mg /ml)	Specific activity (mmO_2 /min / mg)	Yield	Purification
Crude extract.	50	950.0	50	0.3800	100	1
$(NH_4)_2SO_4$:						
40 % . . .	15	372.6	18	1.3680	39.2	3.5
50 % . . .	15	270.0	18	1.0640	28.4	2.5
Dialysed $(NH_4)_2SO_4$:						
40 % . . .	10	243.6	12.0	2.0140	25.6	5
50 % . . .	10	126.0	9.0	1.4060	13.3	3.5

The standard reaction mixture composition was: linoleic acid, 4.0 mM, in Phosphate buffer, 0.1 M pH 6.3, 3.0 ml; enzyme preparation, 5-30 µl. The substrate solution was oxygenated at 25 °C for 1.25 min immediately prior to the addition of the enzyme. Oxygen uptake was monitored at 25 °C using an oxygen electrode.

Overnight dialysis resulted in a 5-fold purification in the 40 per cent fraction and a 3.5-fold purification in the 50 per cent fraction. Separation of the dialysed 40 per cent ammonium sulfate fraction on Sephadex G-200 resulted in a further

6-fold purification of the enzyme, and a 30-fold purification compared to the original crude extract. The result is shown in figure 1.

With respect to *Lupinus albus* (Blanca) a 7-fold purification was obtained from the 40 per cent ammonium sulfate fraction and a 3.5-fold purification from the 50 per cent ammonium sulfate fraction (Table 3).

TABLE 3

Yields and enrichment of lupin lipoxygenase at various stages of purification

Procedure	Vol (ml)	Total units	Protein (mg/ml)	Specific activity (mmO$_2$/min/mg)	Yield	Purification
Crude extract.	122	500.2	73	0.0560	100	1
$(NH_4)_2SO_4$:						
40 % . . .	12	157.2	32	0.4099	32	7
50 % . . .	15	193.5	68	0.1904	39	3.5

The standard reaction mixture composition was: linoleic acid, 4.0 mM, in phosphate buffer, 0.1 M pH 6.5, 3.0 ml; enzyme preparation, 15-30 µl. The substrate solution was oxygenated at 25 °C for 1.25 min., immediately prior to the addition of the oxygen. Oxygen uptake was monitored at 25 °C using an oxygen electrode.

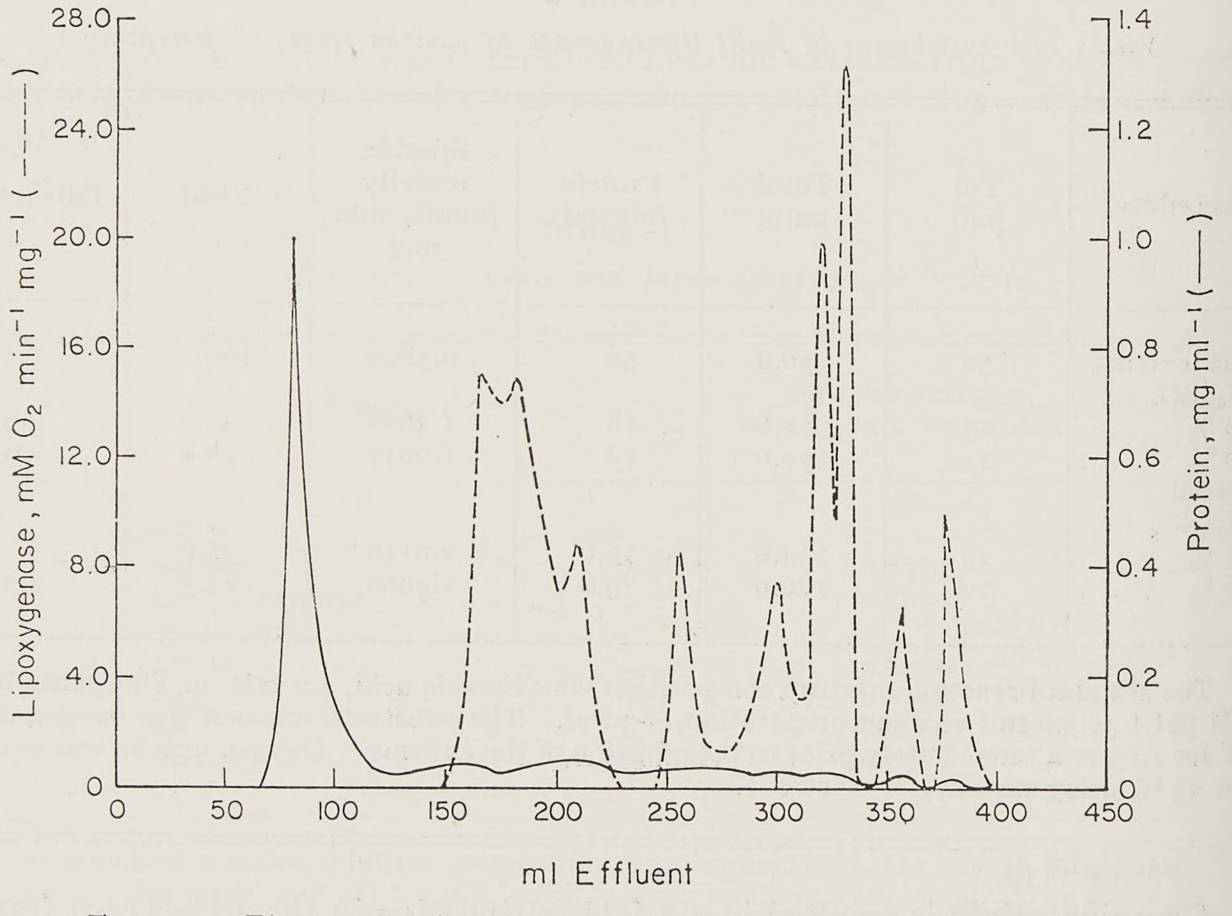


FIG. 1. — *First-step purification of lentil lipoxygenase on sephadex G-200.*

Column dimensions: 50 × 2 cm, sample 24 mg protein; the eluent was phosphate buffer, 0.01 M, pH 6.3; elution flow rate 20 ml/hr - - - -, lipoxygenase; ——, protein.

Substrate specificity

The two fractions obtained from ammonium sulfate precipitation of lupin and lentil lipoxygenase both showed a high degree of specificity towards linoleic and linolenic acids. Only slight activity was evident when these free fatty acids were replaced by methyl linoleate, trilinolein, dilinolein or monolinolein.

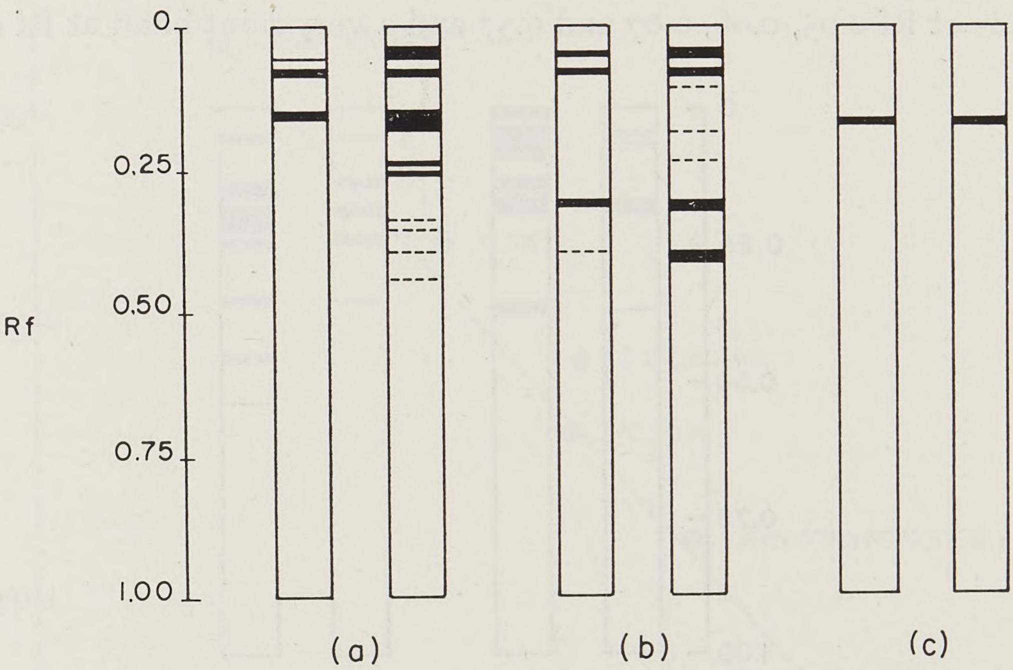


FIG. 2. — *Disc gel electrophoresis of partially purified lentil lipoxygenase.*

Respective lipoxygenase and protein bands from discgel electrophoresis at pH 9.3 of (a) the dialysed 40 per cent ammonium sulfate fraction; (b) the dialysed 50 per cent ammonium sulfate fraction; (c) the lipoxygenase peak from Sephadex G-200 gel filtration lipoxygenase was detected by starch-iodine staining technique, and protein was stained with amido black.

Isoelectric point

Gel electrofocussing over the pH range of 3-10 indicated that the enzyme possessed one isoelectric point for both lentil and lupin at pH 5.3

Electrophoresis

Lentils

Disc electrophoresis on polyacrylamide gel at pH 9.3 indicated the presence of isoenzymes of lipoxygenase (fig. 2). The isoenzyme pattern of the dialysed 40 per cent ammonium sulfate fraction from lentils consisted of major bands at Rf 0.07 and 0.17 and a faint band at Rf 0.06. The isoenzyme pattern of the corresponding 50 p. 100 dialysed ammonium sulfate fraction consisted of a major band at Rf 0.32 with minor bands at Rf 0.05 and 0.08 and very faint band at Rf 0.41.

Corresponding protein band patterns indicated major protein bands at Rf 0.05, 0.07, 0.18, 0.32 and 0.41 and in all cases several minor bands. Electro-

phoresis of the third lipoxygenase peak eluted from the Sephadex G-200 column resulted in one enzyme band at Rf 0.18, and one protein band with the same Rf value. Results are shown in fig. 2.

Lupins

Disc gel electrophoresis on polyacrylamide gel at pH 9.3 also indicated the presence of isoenzymes for lupin extracts (fig. 3). The isoenzyme pattern of the 40 per cent ammonium sulfate fraction consisted of a major band at Rf 0.18 and minor bands at Rf 0.05, 0.06, 0.07 and 0.37 and a very faint band at Rf 0.08. The

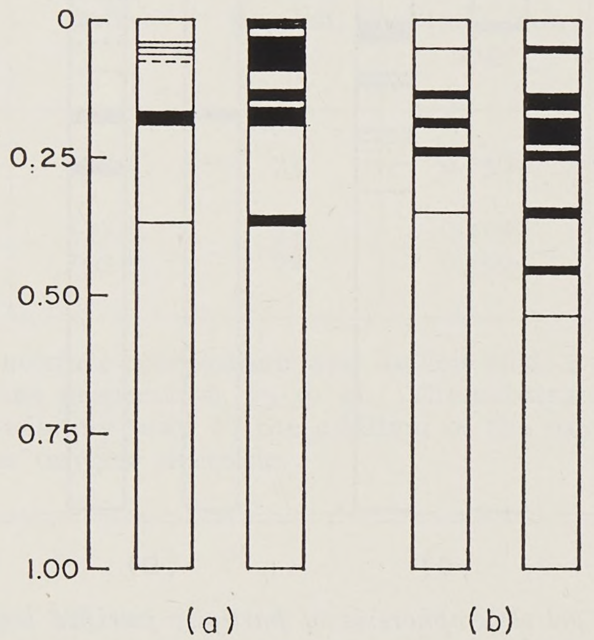


FIG. 3. — *Disc gel electrophoresis of partially purified lupin lipoxygenase.*

Respective lipoxygenase and protein bands from disc gel electrophoresis at pH 9.3 of (a) 40 per cent ammonium sulfate fraction, (b) 50 per cent ammonium sulfate fraction. Lipoxygenase and protein bands were detected by starch-iodine staining technique and amido black respectively.

isoenzyme pattern from the 50 per cent ammonium sulfate fraction indicated 3 major bands at Rf 0.15, 0.20 and 0.25 and a minor band at Rf 0.37. Corresponding protein band patterns indicated major protein bands at Rf 0.03-0.09, 0.09-0.12, 0.14, 0.15-0.18, and 0.19-0.25 with minor bands at Rf 0.35, 0.45 and 0.54. Further purification of lupin lipoxygenase is currently in progress.

Molecular weight

Disc gel electrophoresis (5 % polyacrylamide gel, pH 7.2) in the presence of 0.1 % sodium dodecyl sulfate revealed a major band for the third lentil lipoxygenase peak eluted from the Sephadex G-200. The molecular weight was calculated to be 110,000 (fig. 4).

Discussion

A considerable amount of non-enzyme protein was eluted from the Sephadex G-200 column prior to elution of the lentil enzyme. Conclusions can not be drawn until a second-step fractionation on DEAE-cellulose and Sephadex gel filtration has been carried out.

Both lentil and lupin lipoxygenases possess an isoelectric point of 5.3. The pI values reported for fababean were 5.5 (Eskin and Henderson, 1976), for pea lipoxygenase 5.8 (Eriksson and Svensson, 1970), 6.00-6.15 (Arens *et al.*, 1973) and 5.85-6.17 with a peak at 5.97 (Fredriksson, 1974), and for soybean lipoxygenase were 5.4 (Theorell *et al.*, 1947) and 5.65 (Catsimpoolas, 1969). The

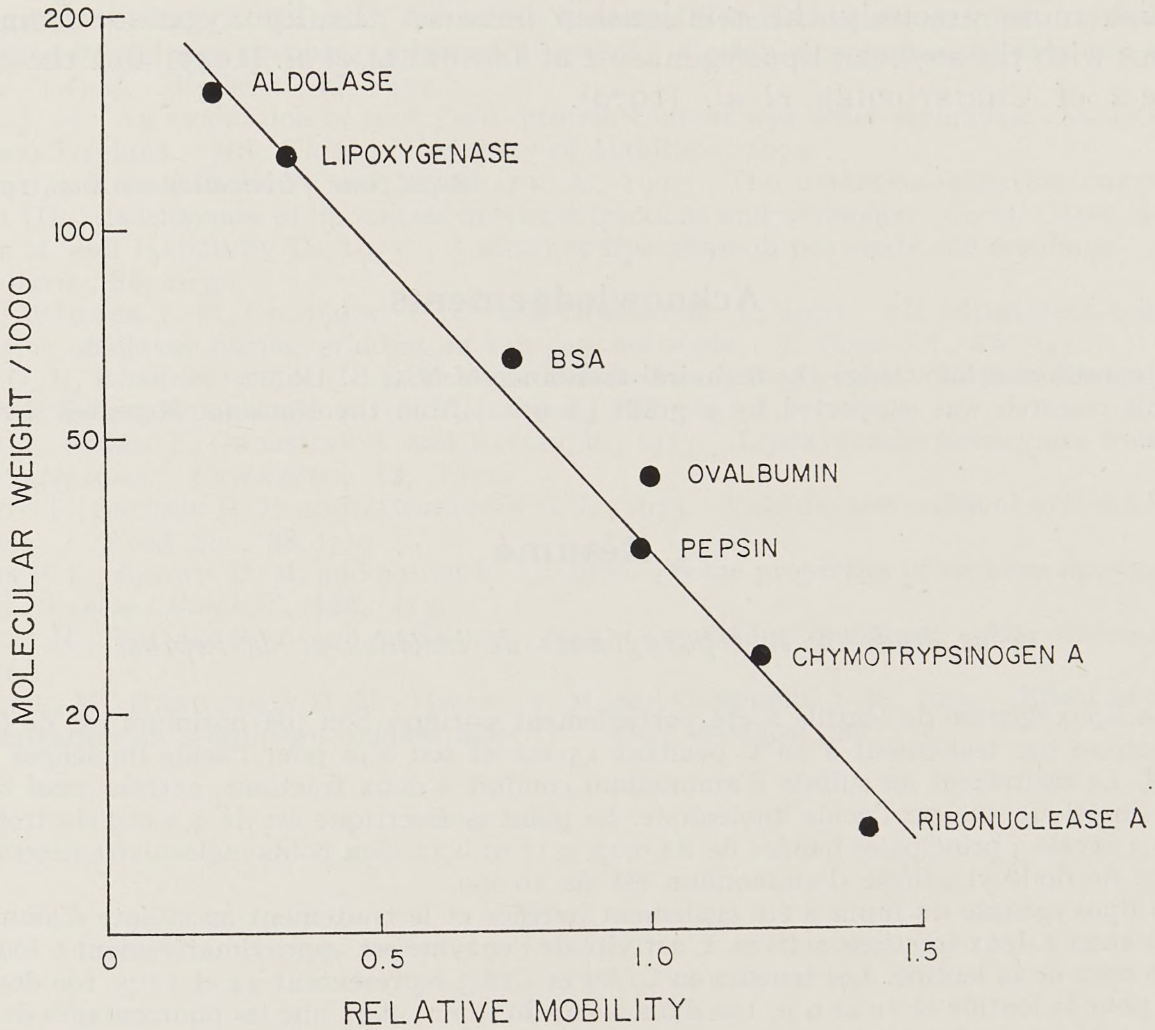


Fig. 4. — *Calibration curve for the determination of lentil lipoxygenase molecular weight*

Electrophoresis was undertaken on 5 per cent polyacrylamide gels at pH 7.2 in the presence of 0.1 per cent sodium dodecyl sulfate. Lipoxygenase was detected by the starch-iodine staining technique, and proteins were stained with Coomassie Blue R. The relative mobility was calculated by dividing each Rf value by that of ovalbumin. BSA = Bovine serum Albumin.

molecular weight of lentil lipoxygenase was calculated to be 110,000. Molecular weights of 102,000 (Theorell *et al.*, 1947) and of 108,000 (Stevens *et al.*, 1970), have been obtained for soybean lipoxygenase and 105,000 for fababean lipoxygenase (Eskin and Henderson, 1976).

Electrophoresis at pH 9.3 of the partially purified fractions revealed isoenzyme patterns for lupins and lentils, consisting of major bands at Rf 0.07, 0.18 and 0.32 for lentils and at Rf 0.18 and 0.25 for lupins. Eskin and Henderson (1976) employing disc electrophoresis on polyacrylamide gel in conditions similar to this study demonstrated the presence of a major band at Rf 0.22-0.27 for fababean lipoxygenase. Christopher *et al.* (1970) under identical conditions reported an Rf of 0.25 for a purified soybean lipoxygenase isoenzyme. This isoenzyme designated lipoxygenase-2 was distinct from the classical crystalline soybean lipoxygenase-1 of Theorell *et al.* (1947) which possessed a higher electrophoretic

mobility. The presence of a major band at Rf 0.18 in the 40 per cent $(NH_4)_2SO_4$ fraction of lupins and lentils and respective pH values of 6.3 and 6.5 would indicate a resemblance to the lipoxygenase-2 of CHRISTOPHER *et al.* (1970). A band at Rf 0.32 in the 50 per cent $(NH_4)_2SO_4$ fraction of lentil would indicate a mobility close to the lipoxygenase-1 described by THEORELL *et al.* (1947). Studies are presently continuing to characterize lentil and lupin lipoxygenase in order to establish more precisely the relationship between the lipoxygenase from these legumes with the soybean lipoxygenase-1 of THEORELL *et al.* (1947) and the lipoxygenase-2 of CHRISTOPHER *et al.* (1970).

Reçu pour publication en mai 1977.

Acknowledgements

The authors acknowledge the technical assistance of Miss B. DOIGT.
This research was supported by a grant (A 9712) from the National Research Council of Canada.

Résumé

Une étude de la lipoxygénase de lentilles et de lupins

La lipoxygénase de lentille a été partiellement purifiée. Son pH optimum est de 6,3, elle est inactivée par traitement à 70 °C pendant 15 mn et son Km pour l'acide linoléique est de 2,8 mM. Le traitement au sulfate d'ammonium conduit à deux fractions, actives aussi bien sur l'acide linoléique que sur l'acide linolénique. Le point isoélectrique est de 5,3 et l'électrophorèse à pH 9,3 révèle 3 principales bandes de Rf 0,07, 0,17 et 0,32. Son poids moléculaire déterminé en présence de dodécyl sulfate d'ammonium est de 10 000.

La lipoxygénase du lupin a été également purifiée et le traitement au sulfate d'ammonium conduit aussi à deux fractions actives. L'activité de l'enzyme est approximativement 6 fois moindre que celle de la lentille. Les teneurs en C18:2 et C18:3 représentent 44 et 12 p. 100 des acides totaux pour la lentille et 20 et 9 p. 100 dans le cas du lupin, alors que les pourcentages de lipides sont respectivement de 2 et de 13 p. 100. Ces acides gras sont très sensibles à l'oxydation et comme il a été signalé que les lentilles deviennent rances très rapidement après rupture mécanique des tissus, un problème identique, dans lequel la lipoxygénase est impliquée peut se poser pour le lupin.

Mots clés : Lentilles, lupines, lipoxygénase.

Références

ARENS D., SEILMEIER W., WEBER F., KLOOS G. and GROSCH W., 1973. Purification and properties of a carotene co-oxidising lipoxygenase from peas. *Biochim. Biophys. Acta*, **327**, 295.

BEAUX Y. and DRAPRON R., 1975. Isolation and some physicochemical characteristics of lipoxygenase of the horse bean (*Vicia faba*). *Ann. Technol. Agri.*, **23**, 309.

BEN-AZIZ A., GROSSMAN S., BUDOWSKI P. and ASCARELLI I., 1971. Enzymic oxidation of carotene and linoleate by alfalfa: properties of active fractions. *Phytochem.*, **10**, 1823.

BLAIN J. A., DOHERTY J. J. and TODD J. P., 1959. Lentil Lipoxidase. *Chem. and Ind.*, 1216.

CATSIMPOOLAS N., 1969. Isolation of soybean lipoxidase by isoelectric focussing. *Arch. Biochem. Biophys. Acta*, 198, 2.

CHRISTOPHER J., PISTORIUS E. and AXELROD B., 1970. Isolation of an isoenzyme of soybean lipoxygenase. *Biochem. Biophys. Acta.* 198, 12.

CRAIG F. N., 1936. A fat oxidation system in Lupinus albus. *J. Biol. Chem.*, **114**, 727.

DAVIES B. J., 1964. Disc electrophoresis-II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404.

DUNKER A. K. and RUECKERT R. R., 1969. Observations on molecular weight determinations on polyacrylamide gel. *J. Biol. Chem.*, **244**, 5074.
ERIKSSON C. E. and SVENSSON S. G., 1970. Lipoxygenase from peas, purification and properties of the enzyme. *Biochim. Biophys. Acta*, **198**, 449.
ESKIN N. A. M. and HENDERSON H. M., 1974. Lipoxygenase in Vicia faba minor. *Phytochem.* **13**, 2713.
ESKIN N. A. M. and HENDERSON H. M., 1976. A study of lipoxygenase from small fababeans. Proceedings of IV International Congress of Food Science and Technology (in press).
FREDRIKSSON S., 1974. Scanning isoelectric focusing in small density-gradient columns III. A method for detailed mapping of biological activity of column contents applied to pea lipoxygenase. *Anal. Biochem.* **57**, 452.
FURGAL J. F. An evaluation of seed yield, protein content and other agronomic characteristics of genus Lupinus. MSc Thesis, University of Manitoba, 1974.
GUSS P. L., RICHARDSON T. and STAHMANN A., 1967. The oxidation-reduction enzymes of wheat III. Isoenzymes of lipoxidase in wheat fractions and soybeans. *Cereal Chem.*, **44**, 607.
HAYDAR M. and HADZIYEV D., 1973. A study of lipoxidase in pea seeds and seedlings. *J. Sci. Food Agric.*, **24**, 1039.
KON S., WAGNER J. P., GUADAGNI D. G. and HORVAT R. J., 1970. pH adjustment control of oxidative off-flavor during grinding of raw legume seeds. *J. Food Sci.*, **35**, 343.
LOWRY O. H, ROSEBROUGH N. J., FARR A. L. and RANDALL R. J., 1951. Protein determination with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265.
PINSKY A., SPORN J., GROSSMAN S. and RIVLIN M., 1973. Lipoxygenase isoenzymes from *Solanum tuberosum*. *Phytochem.*, **12**, 1051.
RESTREPO F., SNYDER H. E. and ZIMMERMAN G. L., 1973. Calcium activation of soybean lipoxygenase. *J. Food Sci.*, **38**, 779.
STEVENS F. C., BROWN D. M. and SMITH E. L., 1970. Some properties of soybean lipoxygenase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **136**, 413.
THEORELL H., HOLMAN R. T. and AKESON A., 1947. Crystalline lipoxidase. *Acta. Chem. Scand.*, **1**, 571.
YAMAGUCHI M., HENDERSON H. M., HWANG P. M. and CAMPBELL J. D., 1969. Effect of oxygen concentration on o-diphenol oxidase activity. *Anal. Biochem.*, **32**, 178.

Ann. Technol. agric., 1977, **26** (2), 151-159.

Degradation of fatty acid hydroperoxide by cereals and a legume : A comparison (*)

H. W. GARDNER and D. J. SESSA

Northern Regional Research Center, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, Peoria, Illinois 61604 U.S.A.

Summary

Many plant enzymes or pseudo-enzymes exist that degrade fatty acid hydroperoxides. To compare hydroperoxide decomposition in cereals two systems seem to predominate, linoleic acid hydroperoxide isomerase (LAHI) and hydroperoxide degradation by flour-water mixtures. LAHI usually found in the germ, has been discovered in every major cereal grain except rice, sorghum and oat.

The reactions occurring in flour water mixtures, seem to be restricted to the endosperm of the grain.

Recent work with soybean and other legumes indicates an absence of LAHI. Rather we propose that in soy and perhaps other legumes the enzymes acting on hydroperoxides are peroxidases and other metalloproteins, like lipoxygenase and cytochromes. Virtually all oxygenated fatty acids derived from soy are identical to those oxygenated fatty acids obtained by degrading fatty acid hydroperoxides by model systems, such as ionic iron-cysteine or hemoglobin. The evidence for this analogy has been strengthened by our recent research.

Key-Words: Cereals, Soybean, Fatty acid hydroperoxides, degradation.

Many plant enzymes or pseudo-enzymes exist that degrade fatty acid hydroperoxides. Although it may be somewhat premature to compare hydroperoxide-degrading enzyme systems from different plant families, emerging patterns indicate that cereal grains may be substantially different from legumes in this regard.

In cereals, two systems seem to predominate : (a) linoleic-acid-hydroperoxide-isomerase, and (b) hydroperoxide degradation by flour-water mixtures.

Linoleic-acid-hydroperoxide-isomerase, first reported in flaxseed by ZIMMERMAN (1), has been found in every major cereal grain, except rice, sorghum and oat. A number of workers have verified the presence of isomerase in wheat, corn, rye and barley by the presence of product α- or γ-ketols. We found that wheat and corn germ are better sources of isomerase activity than the endosperm. Further

(*) Présenté au Symposium International I.S.F., « Lipases et lipoxygénases d'origine végétale », Marseille, 30 août-4 septembre 1976.

investigations with corn germ isomerase showed that activity is bound to 105,000 XG particulates as well as to spherosomes (2). Also, the enzyme is particulate bound in many other plants (3).

The product specificity of isomerase is shown in fig. 1. Basically, two products are formed, an α-ketol and γ-ketol. Common to both products is an oxo-group

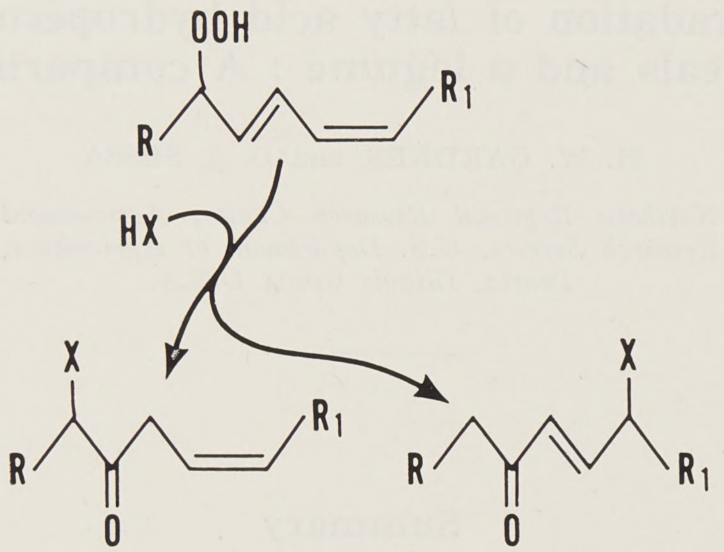


FIG. 1. — *Pathway of α- and γ-ketol formation by linoleic-acid-hydroperoxide-isomerase. Reprinted with permission from Gardner, H. W. et al., Lipids* 10, 602 (1975). *Copyright by American Oil Chemists' Society.*

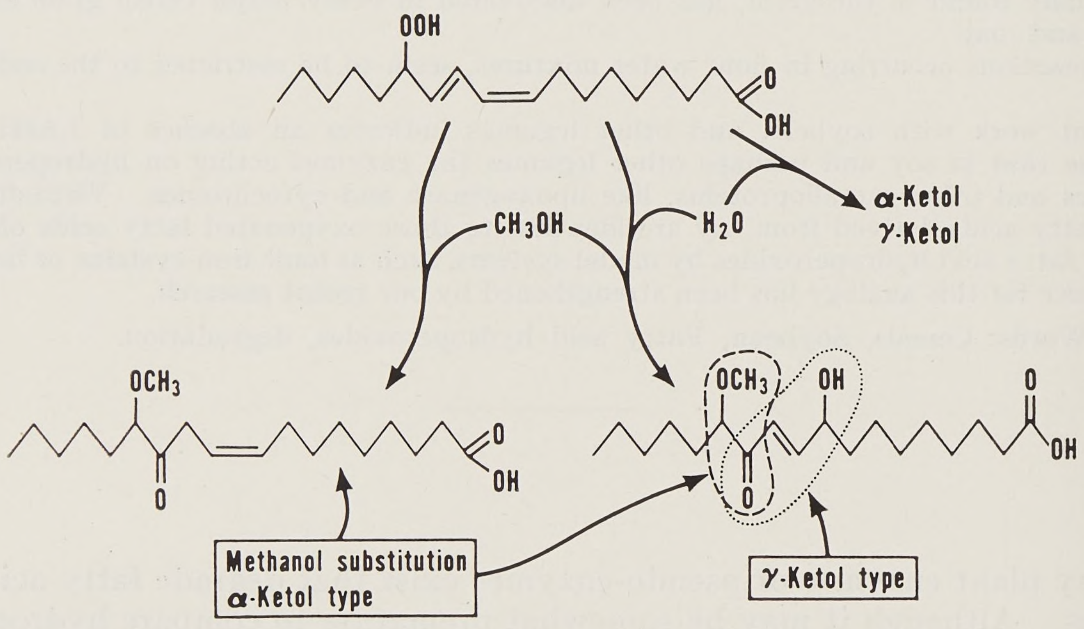


FIG. 2. — *Proposed pathway of formation of* 12-oxo-13-*methoxy*-9-*hydroxy*-trans-10-*octadecenoic acid and other products by linoleic-acid-hydroperoxide-isomerase in the presence of* 20 *per cent methanol. Reprinted with permission from Gardner, H. W. et al., Lipids* 10, 602 (1975). *Copyright by American Oil Chemists' Society.*

alpha to the carbon originally bearing the hydroperoxygroup. Veldink and coworkers (4) have shown that the oxo-oxygen is derived from the hydroperoxy-group. The solvent, represented by HX in fig. 1, is usually water, and, thus, in this case X is a hydroxy-group. However, in the presence of fatty acids, methanol or ethanethiol, a significant proportion of the product has the substituent group " X " replaced with fatty acyl, methoxy or ethylthio, respectively (5). The order of decreasing reactivity was oleic acid > ethanethiol > methanol > H_2O.

This observed substitution reaction is probably by a typical nucleophilic mechanism.

Another experiment indicated that α- and γ-ketol formation are mediated by the same isomerase enzyme. When isomerase degraded hydroperoxide in 20 per cent methanol, a novel product was formed as shown in fig. 2. In the presence of methanol a double substitution occurred yielding a product characteristic of both an α-ketol and γ-ketol. The formation of this novel compound was taken as evidence for a single enzyme.

ESSELMAN and CLAGETT (6) isolated γ-ketols from a reaction catalyzed by an alfalfa extract, but apparently this reaction is different from the typical isomerase just described. These workers showed that the positional specificity in forming the alfalfa γ-ketol is opposite of that observed with corn germ isomerase (fig. 3). In other words, the hydroperoxy-group is converted to a hydroxy-group and the oxo-group forms gamma to the hydroperoxide. They also showed that both oxygens of the hydroperoxide are retained by the γ-ketol.

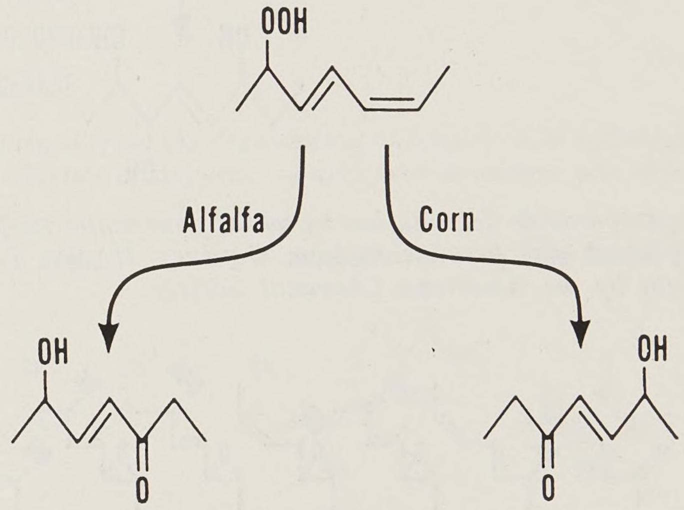


FIG. 3. — *A comparison of the specificity of γ-ketol formation by either alfalfa " lipoperoxidase " or linoleic-acid-hydroperoxide-isomerase from corn germ. Structures are abbreviated.*

Recently, YABUUCHI and AMAHA (7) reported that the positional specificity of barley isomerase was identical to the corn enzyme, rather than the alfalfa enzyme. Thus, barley and corn, both cereals, have the flaxseed type of isomerase and alfalfa, a legume, has an entirely different enzyme. Although isomerase has been reported in other legumes, like peanut, soybean and mung bean, these reports have not been substantiated by isolation of either ketol. In our opinion, isomerase does not exist in soybean because of the apparent absence of α- and γ-ketols in reactions catalyzed by soy extracts.

The second way cereals degrade hydroperoxides seems to prevail in the endosperm or floury portion of the grain. GRAVELAND (8) was the first to report these reactions in wheat flour-water mixtures (fig. 4). Hydroxydiene, hydroxyepoxyene and trihydroxyene fatty acids are products. Since Graveland's report, a number of other cereal flours have yielded similar results. Although hydroperoxide apparently is not intermediate, lipoxygenase initiates formation of hydroxyepoxyene which then solvolyzes to trihydroxyene. It appears that the epoxide formation is due to peroxide-oxygen addition to the *cis* unsaturation with retention of geometric configuration. It will become obvious in the discussion to follow that these products are in no way formed in the same manner as those products obtained with various legume extracts.

Much of the existing literature on lipid hydroperoxide decomposition by extracts from legumes indicated that this decomposition most resembled chemical models. However, certain products were isolated from chemical models that had not been found in any biological system. One of these products was an oxo-epoxyoctadecenoic acid, which was produced when Fe (III) and cysteine decompos-

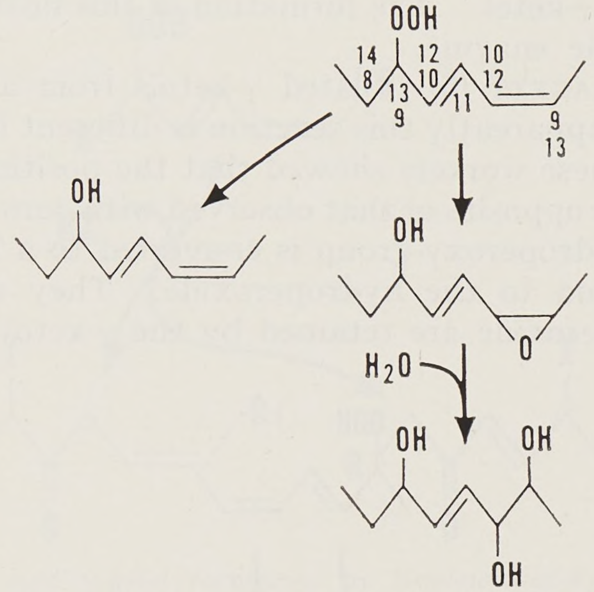
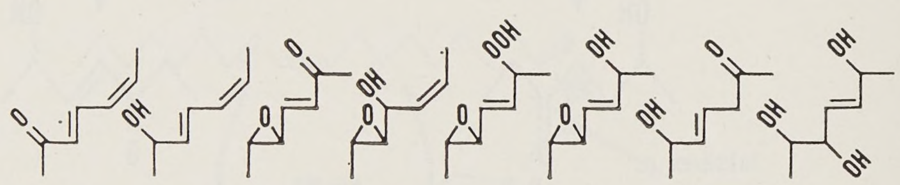


FIG. 4. — *Linoleic acid hydroperoxide degradation by wheat flour-water suspensions* (8). *Structures are abbreviated. Reprinted with permission from Gardner, H. W., J. Agric. Food Chem.* 23, 129 (1975). *Copyright by the American Chemical Society.*



Group	System	1	2	3	4	5	6	7	8
CHEMICAL	Fe^{+++}-CYSTEINE	+	+	+	+	+		+	+
CHEMICAL / BIOCHEMICAL	HEMOGLOBIN	+	+		+		+		
CHEMICAL / BIOCHEMICAL	GUAIACOL LIPOXYGENASE	+	+		+		+		+
BIOCHEMICAL	LIPOXYGENASE-1				+				
BIOCHEMICAL	POTATO	+	+		+				+
BIOCHEMICAL	SOY P-LIPID	+	+		+			+	+
BIOCHEMICAL	SOY HOMOGENATE	+	+	+	+	+			
BIOCHEMICAL	PEA HOMOGENATE	+	+				+		+

FIG. 5. — *Comparison of products from the degradation of linoleic acid hydroperoxide by various chemical and biological systems. Structures are abbreviated.*

ed linoleic acid hydroperoxide in the presence of oxygen. If this reaction was terminated before it went to completion, an epoxyhydroperoxyoctadecenoic acid could be isolated. Theoretically, these two compounds should have been found in one of the legume extracts as well. Thus, we tested our hypothesis by degrading 13-hydroperoxylinoleic acid with a soy homogenate aerated with pure oxygen. Isolated from the soy homogenate were the two compounds observed in the chemical model, 9-oxo-*trans*-12,13-epoxy-*trans*-10-octadecenoic acid and *trans*-12,13-epoxy-9-hydroperoxy-*trans*-10-octadecenoic acid. These were identified by spectral and microchemical methods.

The identification of these two compounds plus research by others gives evidence that legumes catalyze hydroperoxide degradation like the chemical models. Figure 5 compares the products obtained from the chemical models with those isolated from biological systems. The column heading labeled " Soy Homogenate " is the new work that we are reporting. Data in the " Fe(III)-Cysteine " column has been reported by our laboratory previously (9); however, the work is updated by recent experiments. The information tabulated for other

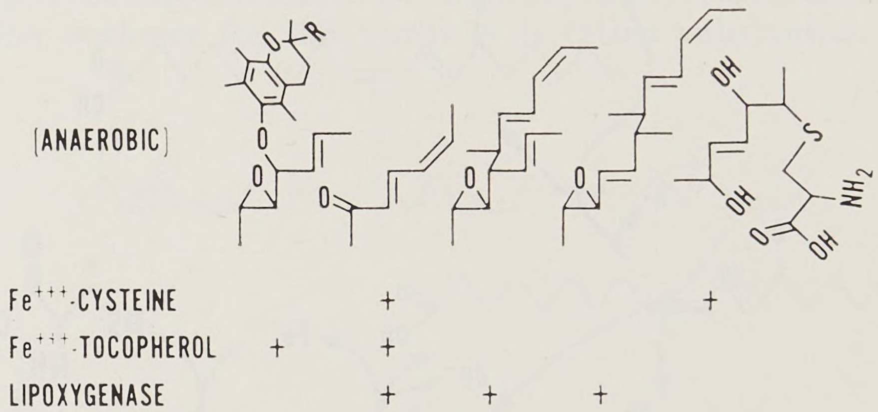


FIG. 6. — *Products obtained from the degradation of linoleic acid hydroperoxide by various catalysts in the absence of oxygen. Fatty acid structures are abbreviated.*

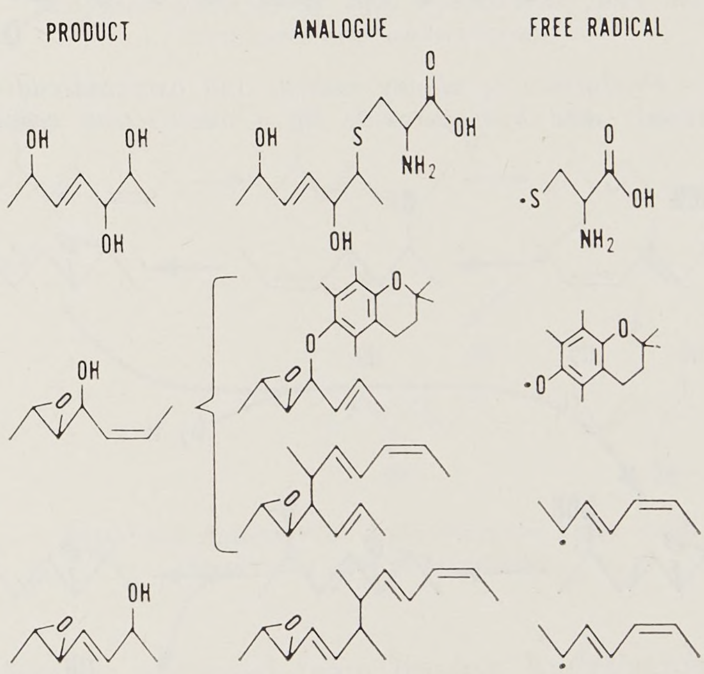


FIG. 7. — *Comparison of products obtained from aerated systems (product column) with those obtained from anaerobic systems (analogue column) and the free radical species responsible for formation of the anaerobic products. Fatty acid structures are abbreviated.*

systems has been reported by others as follows: hemoglobin (10), guaiacol-lipoxygenase (11), lipoxygenase-1 (12), potato (13), soy phosphatidylcholine (14), pea homogenate (15). The nonlegume, potato, is included since these products also were related to those from chemical models. In all cases, a remarkable similarity in products are observed regardless of the catalyst.

Also, products obtained under anaerobic conditions should be noted. In the absence of oxygen, oxodiene and compounds analogous to those discussed above are found in both chemical and biological models (fig. 6).

The analogues differ from the fatty acid products by the replacement of a hydroxy-group with a well-known free radical as shown in fig. 7.

Initiation of product formation is probably caused by homolysis of the hydroperoxy-group. A one-electron redox cycle is probably responsible for production

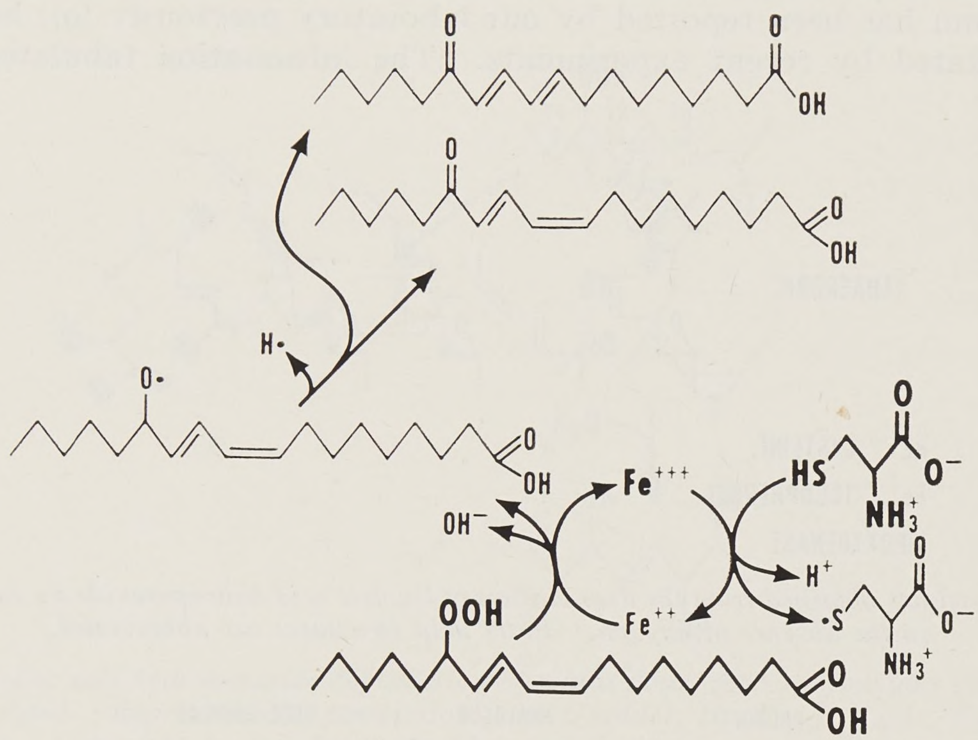


FIG. 8. — *Production of alkoxy radical and oxooctadecadienoic acid from linoleic acid hydroperoxide by a one-electron redox cycle.*

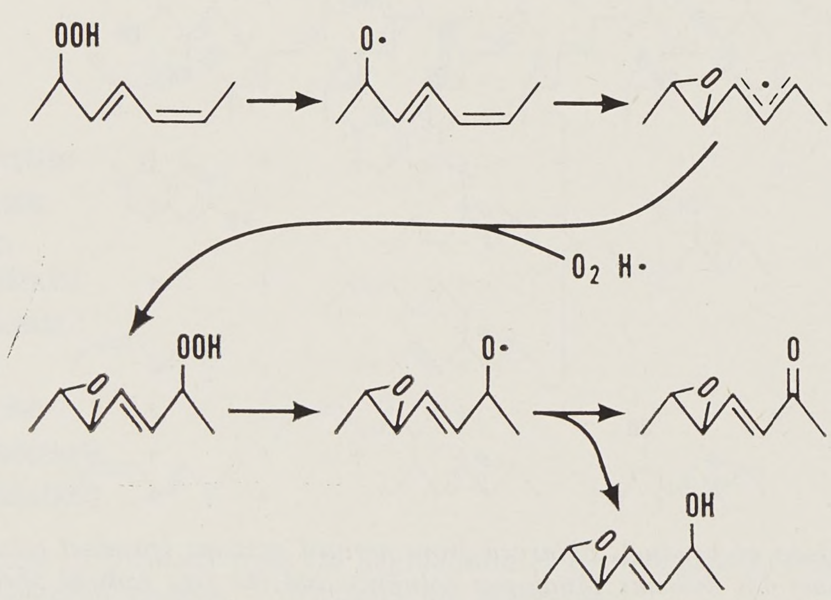


FIG. 9. — *Secondary hydroperoxidation in the formation of oxygenated epoxy fatty acids. Structures are abbreviated.*

of alkoxy radicals in the Fe(III)-cysteine model (fig. 8). This alkoxy radical could then decompose into a variety of fatty acids, like oxodiene shown at the top of fig. 8. Hydroxydiene also can be produced from the alkoxy radical by gain of a hydrogen radical.

We believe oxygen plays a major role in the formation of oxygenated fatty acids other than oxodiene and hydroxydiene. As noted previously, the absence of oxygen results in analogues which added available radicals to the conjugated

diene. In the presence of air, oxygen becomes an effective competitor with the other radicals; thus, the so-called analogues decrease in relation to the oxygenated fatty acids. Figure 9 shows how oxygen may participate in the reaction. Oxygen adds to the epoxyallylic radical to form the hydroperoxide shown. The hydroperoxide then decomposes to oxoepoxyene and hydroxyepoxyene fatty acids. As discussed previously, we have succeeded in isolating the epoxyhydroperoxy intermediate. To prove that it is an intermediate, we treated the epoxyhydroperoxy fatty acid with Fe(III) and cysteine and observed the formation of two products, oxoepoxyoctadecenoic acid and hydroxyepoxyoctadecenoic acid. Therefore, we feel the evidence for this pathway is rather substantial. It is curious

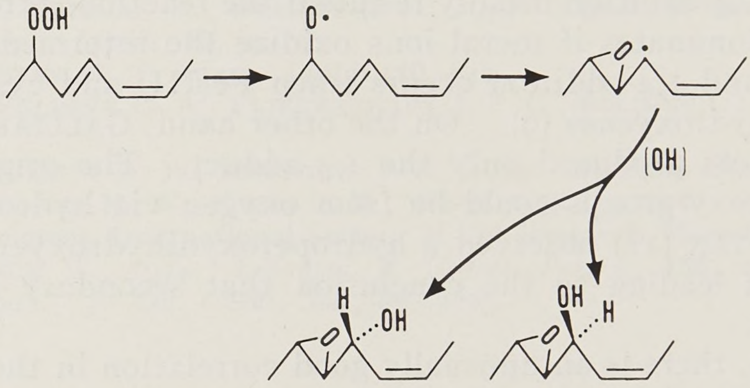


FIG. 10. — *Proposed pathway of hydroxyepoxyene fatty acid formation. Structures are abbreviated.*

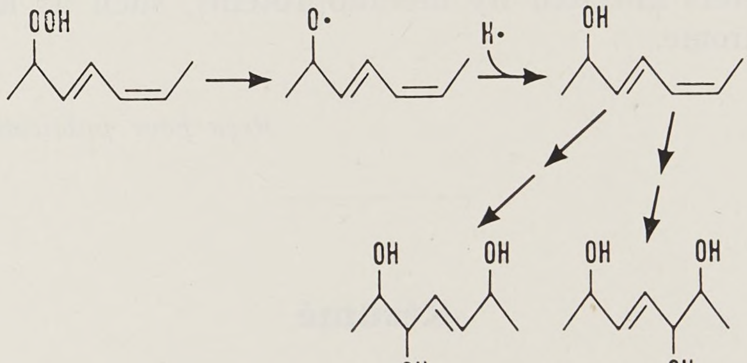


FIG. 11. — *Proposed pathway of trihydroxyene fatty acid formation. Structures are abbreviated.*

that in product mixtures obtained from linoleic hydroperoxide with a Fe(III)-cysteine catalyst, we do not find the particular hydroxyepoxyoctadecenoic acid shown in this pathway. There is a possibility that this particular epoxide readily solvolyzes to trihydroxyoctadecenoic acid or oxidizes to other products, but these hypotheses have not been tested.

Another type of hydroxyepoxyoctadecenoic acid is more common (fig. 10). In this structure the hydroxy-group is alpha to the epoxide; therefore, erythro and threo isomers are possible. Both of these isomers are found when either Fe(III) and cysteine or hemoglobin are catalysts. In a previous publication (9) we had incorrectly assigned a *trans* unsaturation to the threo isomer. After collaborating with Galliard and coworkers (13), we concluded that both erythro and threo isomers are produced by the Fe(III)-cysteine model, both with predominantly *cis* unsaturation. In a homolytic model it is expected that both isomers would

form. The hydroxy-group could arise from molecular oxygen or from solvent via a carbonium ion. A carbonium ion could arise from metal ion oxidation of the radical. However, it should be pointed out that many biological systems apparently yield only the threo isomer, which implies a controlled reaction. According to Garssen and coworkers (12), soy lipoxygenase-1 produces only the threo isomer with 70 per cent retention of both hydroperoxide oxygens.

Previously, we mentioned that trihydroxyene fatty acids could arise from solvolysis of one of the hydroxyepoxyene fatty acids, that is, the one with a double bond vicinal to both the hydroxy- and epoxy-groups. However, we believe it is more likely that they are derived from addition to the hydroxydiene (fig. 11). Addition to the conjugated diene can occur either 1,2 or 1,4 as shown. According to the literature, 1,4-addition usually results if the reaction is free radical directed. 1,2-Addition predominates if metal ions oxidize the intermediate allylic radical (16). Both 1,2- and 1,4-addition occurs when Fe(III) and cysteine catalyze the production of trihydroxyenes (9). On the other hand, GALLIARD *et al.* (13) found that potato extracts produced only the 1,4-adduct. The origin of at least two of the three hydroxy-groups could be from oxygen via hydroperoxide moieties. STRECKERT and STAN (11) observed a hydroperoxydihydroxyene in a model lipoxygenase reaction leading to the conclusion that secondary hydroperoxidation may be occurring.

In conclusion, there is an unusually good correlation in the products isolated from the chemical models versus those from the legumes, soy and pea. Legumes may resemble the chemical model in that both systems degrade lipid hydroperoxide through homolytic cleavage of the hydroperoxy-group. This could occur via one-electron transfers initiated by metalloproteins, such as lipoxygenase, peroxidase and cytochrome.

Reçu pour publication en mai 1977.

Résumé

Comparaison des modes de dégradation des hydroperoxides d'acides gras par les céréales et une légumineuse

De nombreux enzymes ou pseudo-enzymes d'origine végétale dégradent les hydroperoxydes d'acides gras. Deux systèmes semblent prédominer dans les céréales : l'isomérase des hydroperoxydes de l'acide linoléique (LAHI) et le système présent dans les mélanges d'eau et de farine intervenant dans la dégradation des hydroperoxides.

Le LAHI, habituellement présent dans le germe a été découvert dans les principales céréales, sauf dans le riz, le sorgho et l'avoine.

Les réactions mises en évidence dans les mélanges de farine et d'eau semblent être limitées à l'endosperme du grain. Un récent travail sur le soja et d'autres légumineuses indiquent l'absence de LAHI. Aussi, nous faisons l'hypothèse que dans le soja et peut-être dans les autres légumineuses, les enzymes agissant sur les hydroperoxydes sont des peroxydases et autres métalloprotéines comme la lipoxygénase et les cytochromes. Virtuellement, tous les acides gras oxygénés dérivés du soja sont identiques à ceux des acides oxygénés obtenus par dégradation des hydroperoxydes au moyen de systèmes modèles tels que cystéine-ions Fe ou l'hémoglobine.

Mots clés : Céréales, soja, acide gras, hydroperoxides, dégradation.

Références

(1) Zimmerman D. C., 1966. Biochem. Biophys. *Res. Commun.*, **23**, 398.
(2) Gardner H. W., Christianson D. D., 1972. Communication at the 11th Congress, International Society of Fat Research, Göteborg.
(3) Zimmerman D. C., Vick B. A., Borg T. K., 1974. *Plant Physiol.*, **53**, 1.
(4) Veldink G. A., Vliegenthart J. F. G., Boldingh J., 1970. *Febs* (Fed. Eur. Biochem. Soc.) *Lett.*, **7**, 188.
(5) Christianson D. D., Gardner H. W., 1975. *Lipids*, **10**, 448.
(6) Esselman W. J., Clagett C. O., 1974. *J. Lipid Res.*, **15**, 173.
(7) Yabuuchi S., Amaha M., 1976. *Phytochemistry*, **15**, 387.
(8) Graveland A., 1970. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **47**, 352.
(9) Gardner H. W., Kleiman R., Weisleder D., 1974. *Lipids*, **9**, 696.
(10) Hamberg M., 1975. *Lipids*, **10**, 87.
(11) Streckert G., Stan H. J., 1975. *Lipids*, **10**, 847.
(12) Garssen G. J., Veldink G. A., Vliegenthart J. F. G., Boldingh J., 1976. *Eur. J. Biochem.*, **62**, 33.
(13) Galliard T., Phillips D. R., Matthew J. A., 1975. *Biochim. Biophys. Acta*, **409**, 157.
(14) Sessa D. J., Gardner H. W., Kleiman R., Weisleder D., 1976. Communication at the 13th World Congress, International Society of Fat Research, Marseille.
(15) Arens D., Grosch W., 1974. *Lebensm. Z. Unters. Forsch.*, **156**, 292.
(16) Kochi J. K., 1962. *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 2785.

Ann. Technol. agric., 1977, **26** (2), 161-165.

Determination of phospho- and galactolipase activities in vegetable material (*)

R. DUDEN, K. H. PARK, A. FRICKER

Federal Research Center for Nutrition, D — 75 Karlsruhe 1, *Engesser Strasse* 20. *Deutsche Bundesrepublik*

Summary

The presence of an acyl lipid hydrolase in spinach is demonstrated.

A method based on TLC is given for measuring phospholipase, monogalactolipase, and digalactolipase activities occurring in suspensions of powdered freeze-dried spinach in phosphate buffer, pH 7.

As an example for a possible application of the method presented, the decrease of the phospholipase activity as a function of heating time and temperature is shown.

Key-Words: Spinach, Phospholipase, Galactolipase, determination.

When, during food processing, the tissues and cells of the agricultural products are destroyed — for instance, by freezing — a biochemical chaos occurs: enzymes and substrates, being separated from each other in their original state, come into close contact. They react rapidly now, eliminating natural control mechanisms.

In plant material the following reaction sequence, causing sometimes drastic sensoric changes during processing and storage, seems to be of general importance:

1) Hydrolysis of phospholipids and galactolipids by a lipid acyl hydrolase: free fatty acids are formed and the corresponding water-soluble molecule residues (the latter being of minor importance from our point of view);

2) Linoleic and higher unsaturated acids formed during these reactions can be oxidized by lipoxigenase. Peroxides are formed which are readily degraded through different pathways into compounds of high sensoric activity.

In this paper the occurrence of strong phospho- and galacto-lipase activities in spinach leaves is demonstrated, and a simple activity tests is presented on the basis of thin-layer chromatography.

(*) Présenté au Symposium International I.S.F., « Lipases et lipoxygénases d'origine végétale », Marseille, 30 août-4 septembre 1976.

Since we were not so much interested in isolating pure enzymes and in their characterization, but rather in their mode of action within the food material, we excluded those methods which require the extraction of the enzymes, in view of the fact that during extraction from the membranes activity losses had to be expected. Furthermore the effectors present in the natural medium would be eliminated totally or in part by extraction. Finally, the possible influence on the rate of enzymic reactions by the physical structure of the substrate should

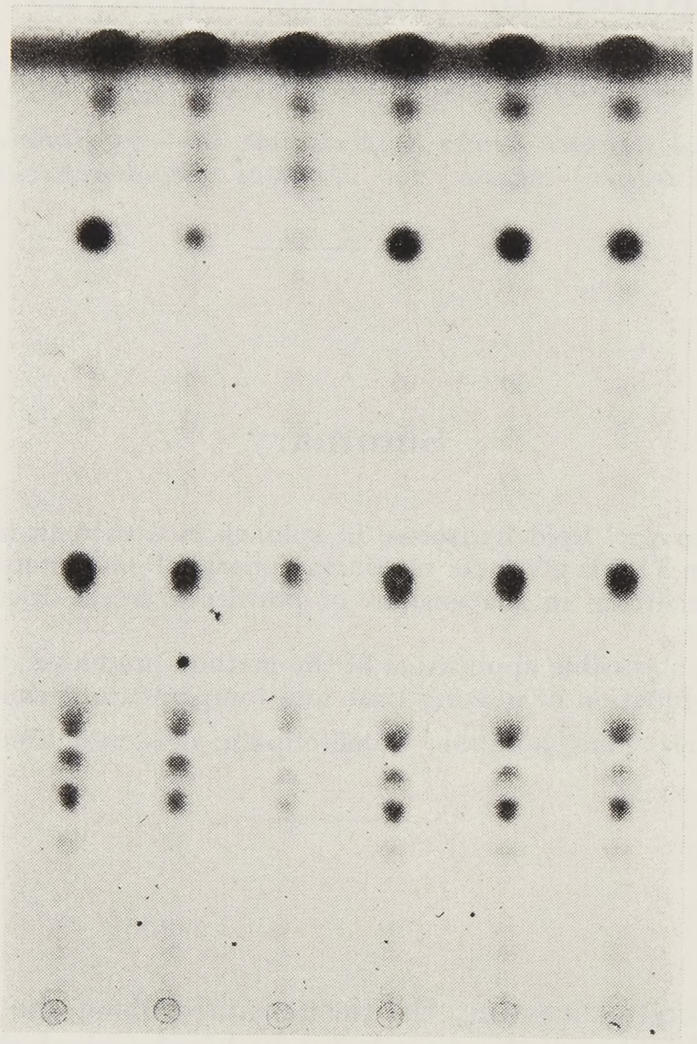


FIG. 1. — *Thin-layer chromatogram of lipid extracts out of powdered freeze-dried spinach, after incubation in phosphate buffer* (0.1 *m, pH* 7) *at* 30 °*C.*
1 *to* 3 *: untreated material.*
4 *to* 6 *: material exposed to a temperature of* 60 °*C for* 1 *minute. Incubation times: right and left side of the chromatogram each* 0, 20 *and* 60 *minutes.*

be taken into acount: the structure of the substrate aggregates within biomembranes is quite different if compared to the structure of the micelles of substrate emulsions, to be used in a homogeneous medium. Therefore activity data of the isolated enzymes may differ widely from those obtained from complex natural mixtures.

Experimental

50 mg of powdered freeze-dried spinach were suspended in 2.5 ml of 0.1 m phosphate buffer, pH 7. The suspension was stirred for certain periods of time at 30 °C. Reactions occurring in the particles were stopped by addition of 2.5 ml methanol.

The suspensions were centrifuged, and non-reacted lipid material was extracted from each residue by chloroform-methanol 2:1. The extracts were evaporated to dryness by a stream of nitrogen and re-dissolved in pure chloroform. These solutions were chromatographed together with a blank extract which was prepared by adding a mixture of methanol and buffer to the spinach powder.

The samples were investigated chromatographically on 20 × 20 cm silica gel G plates (E. MERCK, Darmstadt, FRG). Chloroform-methanol-water 75:25:4 was used as solvent. The plates were treated with sulfuryl chloride, sprayed with water and then heated for 7 minutes at 110 °C. The fluorescence of the spots was

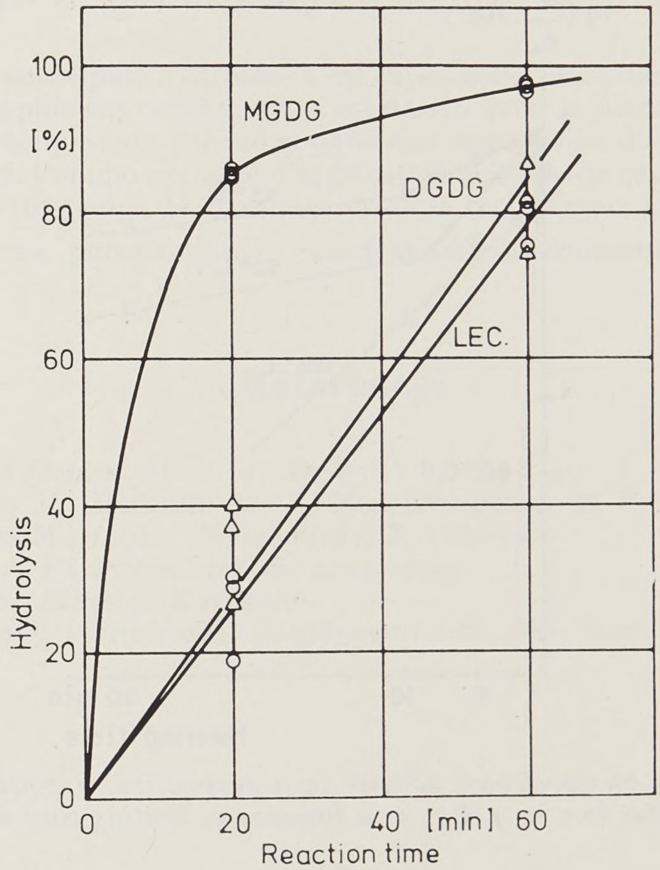


FIG. 2. — *Hydrolysis of lecithine (LEC), digalactosyl diglycerides (DGDG), and monogalactosyl diglycerides (MGDG) in a suspension of powedered freeze-dried spinach in phosphate buffer (0.1 m, pH 7) at 30 °C.*

measured by means of a chromatogram spectrophotometer (1). The fluorescence intensity was recorded against distance to the origin (each peak corresponding to a spot on the chromatogram). Peak areas were calculated from height and half-width, and from these lipid quantities were derived by means of standard curves (2).

Results and discussion

The enzymatic degradation of the polar lipids present in spinach is shown in figure 1. It can be seen on the left side that after a relatively short time nearly all of the lipid material is degraded within the thermally non-treated material. If the spinach was enzyme-inactivated by heat, no changes occurred, as is demonstrated on the right side of the figure.

In order to find out whether the reaction rate is constant for a sufficiently long time period — which is a prerequisit to this method, if used for measuring

enzyme activity —, differences were calculated of lipid quantities contained in extracts from a) unchanged material (enzymatically inactivated by methanol), and b) samples which had been allowed to react for a definite time, as described in the experimental part. These differences were expressed as per cent hydrolysis and plotted against reaction time (fig. 2). In the case of lecithine and digalactosyl diglycerides, straight lines resulted. With monogalactosyldi glycerides, no straight line was obtained. This lipid was hydrolyzed so fast that nearly all of it had disappeared after 20 minutes. In this case reaction time had to be limited to 5-10 minutes, or reaction temperature had to be lowered in order to obtain straight lines.

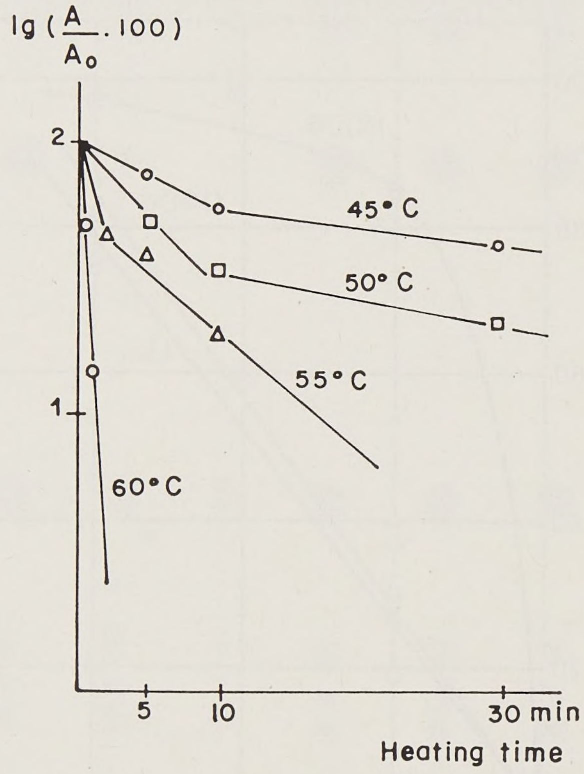


FIG. 3. — *Decrease of the phospholipase activity in a suspension of powdered freeze-dried spinach in phosphate buffer* (0.1 *m*, *pH* 7) *as a function of heating time and temperature.*

The demonstration of a strong galactolipase activity in spinach leaves is in contrast to the findings of SASTRY and KATES (3). Their experiments suggested that these activities are confined to members of the phaseolus family. GALLIARD (4) found strong lipid acyl hydrolase activities in potato tubers, but failed to detect this enzyme complex in spinach leaves.

The rapid degradation of galacto- and phospholipids shown in our experiments may be explained by the better accessibility of the native membrane -bound substrate molecules as compared to the micelles of usual substrate dispersions (5), and /or by structural requirements of the enzyme which, in the case of spinach leaves, seems to be active in the membrane -bound state only.

The activity test described in this paper was applied to follow the course of thermal inactivation of the lipid acyl hydrolase in spinach (5). With lecithine as a substrate, the activity decrease is shown as a function of heating temperature and time (fig. 3).

Similar curves were obtained for the thermal inactivation of mono- and digalactolipase activity. This lends support to the assumption that all three activities are located in one and the same enzyme complex as was suggested by GALLIARD (4) and was postulated also by HIRAYAMA *et al.* (6).

Reçu pour publication en mai 1977.

Acknowledgement

The authors wish to thank Mrs K. RÖCKEL for excellent technical assistance.

Résumé

Détermination des activités
phospho- et galactolipasiques dans un matériel végétal

La présence d'une acyl-lipide hydrolase a été mise en évidence dans l'épinard. Une méthode basée sur la chromatographie sur couche mince est décrite pour la mesure des activités phospho-, monogalacto- et digalactolipasique présentes dans des suspensions d'épinard lyophilisé dans un tampon phosphate, pH 7. Comme exemple d'application possible de cette méthode, la diminution de l'activité en fonction du temps de chauffage et de la température est montrée.

Mots clés : Épinards, phospholipase, galactolipase, détermination.

Références

(1) DUDEN R., 1976. *Lebensm. Wiss. u. Technol.*, **9**, 220-224.
(2) PARK K. H., DUDEN R., FRICKER A. Z. Ernährungswiss (in Press).
(3) SASTRY P. S., KATES M., 1964. *Biochemistry*, **3**, 1280-1287.
(4) GALLIARD T., 1970. *Phytochemistry*, **9**, 1725-1734.
(5) PARK K. H., 1976. Thesis, Karlsruhe.
(6) HIRAYAMA *et al.*, 1975. *Biochimica Biophysical Acta*, **384**, 127-137.

Ann. Technol. agric., 1977, **26** (2), 167-174.

Lipoxygenase activity and water activity in systems of low water content (*)

R. BROCKMANN and L. ACKER

Institut für Lebensmittelchemie der Universität Münster Piusallee 7
D 4400 Münster
Deutsche Bundesrepublik

Summary

The dependence of lipoxygenase-catalyzed oxygenation of lipids on water activity was studied in food related low moisture systems. Enzyme-source was a lipase free, partially purified lipoxygenase preparation from soybeans. Sunflower seed-oil and the mixture of its fatty acids were used as substrates.

Free linoleic acid as well as linoleic acid bound in the triglyceride molecule were attacked by lipoxygenase. The reaction was still going on even at very low moisture levels, thus indicating that the presence of water is no requisite for enzymic lipid oxidation. On the other hand increasing water activities accelerated the oxygenation rate markedly. Thus lipoxygenase exhibits the same behaviour in low moisture systems that has been stated for other enzymes previously. The coherence of oxygenation rate and relative humidity was particularly marked when using triglycerides and less distinct when using free fatty acids as substrates.

In any case enzymic oxygenation and purec hemical autoxidation exhibit opposite dependence on water activity.

Key-Words: Soybean-Lipoxygenase, Water content.

As has been known for some time, enzymatic reactions can take place in dry foodstuffs and cause the substances affected to deteriorate. Systematic research in this field has shown that enzymatic catalysis in the dry state is not only influenced by the water activity or equilibrium relative humidity but that ultimately the mobility of the substrate is decisive (1).

In enzymatic reactions the formation of the enzyme substrate complex plays a central role. That means that enzyme and substrate must come into contact with each other and presupposes that the substrate can make its way to the enzyme. In dry foodstuffs, this prerequisite exists only under certain conditions.

(*) Présenté au Symposium International I.S.F., « Lipases et lipoxygénases d'origine végétale », Marseille, 30 août-4 septembre 1976.

Here the substrate needs some vehicle to facilitate the transport to the enzyme. In most cases this function is fulfilled by the water condensed in pores and capillaries. Consequently, with the activity of water there is an increase in the speed of enzymatic reactions. When the water activity decreases, the amount of capillary water decreases, too. The water molecules are in this case very firmly adsorbed and can offer no further assistance in the transport processes. Thus, enzymatic catalysis comes to a standstill.

Enzymes whose substrates are liquid and are accordingly by nature mobile behave differently. Therefore the lipolysis of liquid triglycerides still takes place even at very low water activities (2). In this case the capacity of the substrate to move maintains the transport processes and, as a result, the enzymatic catalysis. Here, water is not absolutely essential as a vehicle. If the storage temperature is lowered sufficiently for the triglycerides to solidify, the lipolysis comes abruptly to a standstill. It can however be reactivated by adding an inert vehicle, for instance paraffin-oil.

In this case, therefore, the physical state is decisive (3). The ability of the liquid substrates to react is consequently independent of capillary water; nevertheless, in this case too, there can be observed a rise in the reaction rate with increasing water activity. Accordingly water acts as a universal vehicle.

This was to be clearly shown in a reaction totally independent of water, since lipolysis needs at all times that amount of water that is purely stoichiometrically essential for the hydrolysis. A system of this nature, for instance, is the enzymatic oxidation of the essential fatty acids and of the related triglycerides through lipoxygenase.

We consequently extended our investigations to the enzymatic oxidation of triglycerides, fatty acids and phospholipids in dry conditions (4). As a model mixture closely resembling foodstuffs, cellulose as a basic material was impregnated with lipoxygenase active, aqueous extracts from the defatted whole meal of yellow soya beans and freeze dried. Sunflower seed oil or the corresponding fatty acids served as substrates. To maintain definite water activities, the samples were kept over mixtures of sulphuric acid and water. To follow up the activity of the enzyme, samples of the model mixtures were extracted with pentane and the absorbance of the extracts was measured at 234 nm. Other methods, for instance the determination of the peroxide value according to Wheeler or the ferric thiocyanate method according to Hills and Thiel, produced in the same way the oxidation process of the substrates mentioned (5).

On account of the considerable surface area and the dryness of the material it was to be expected that the autoxidation would compete against the enzymatic oxidation. Consequently, to take into account the degree of autoxidation, a heat inactivated sample was kept side by side with the enzyme active sample. The diene absorbance of the inactive sample was determined in the same way and deducted from the value of the main sample.

In order to test which of the two reactions was predominant under the prevailing conditions, both enzyme active and inactive carrier material had added to them 15 per cent of the mixture of fatty acids and were kept at 15 per cent relative humidity (r.h.) and 25 °C. As figure 1 shows, the oxidation in the enzyme active sample began to work even at this low degree of water content considerably more rapidly than the autoxidation which in any case takes place relatively rapidly under these conditions. Whereas the main phase of the enzymatic oxidation was already completed the autoxidation was still in its lag phase. The rapid increase in optical density was accordingly to be ascribed to the activity

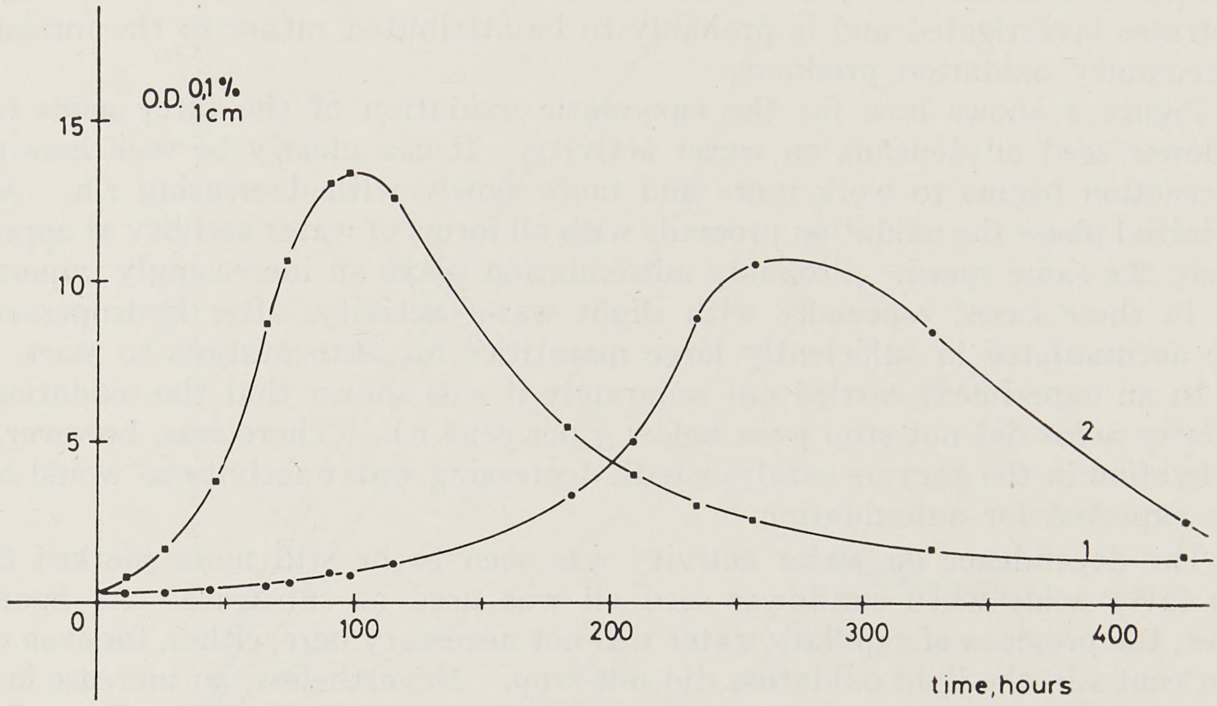


FIG. 1. — *Enzymic oxidation* (1) *and autoxidation* (2) *of the fatty acids from sunflower seed oil at* 15 *per cent rh. and* 25 °C.

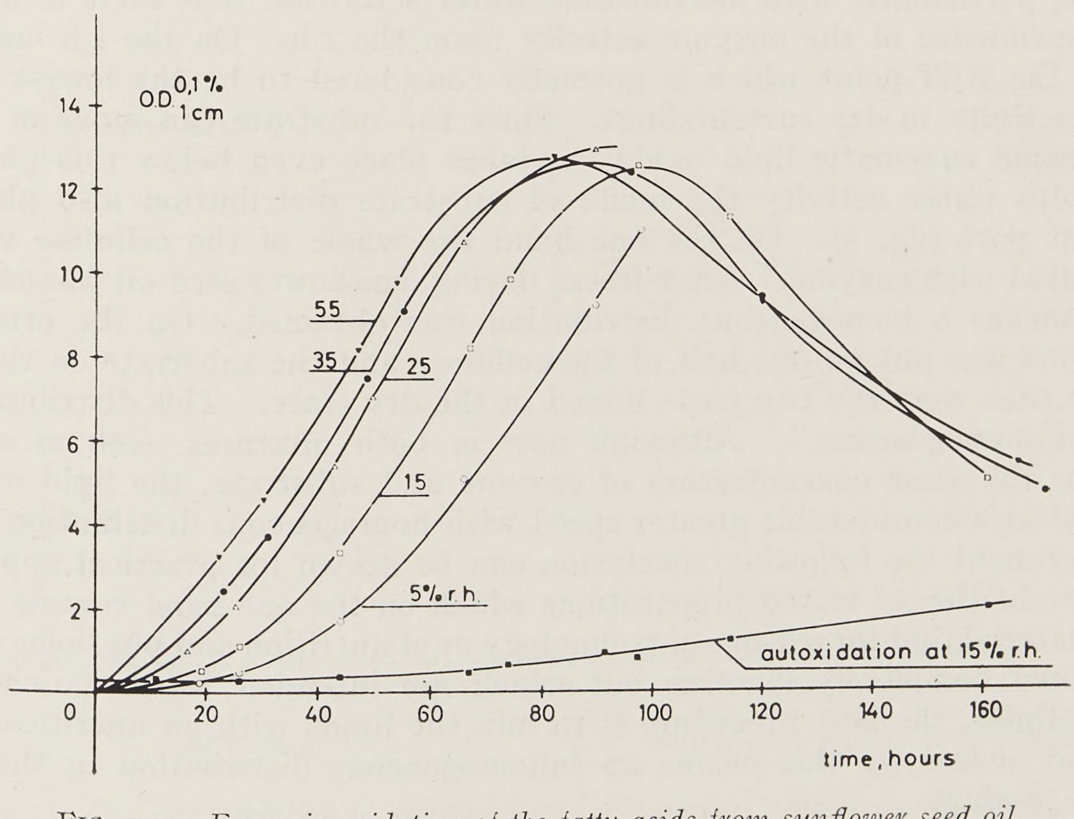


FIG. 2. — *Enzymic oxidation of the fatty acids from sunflower seed oil at various relative humidities and* 25 °C.

of the enzyme. Thus, lipoxygenase activity was measured in the following experiments as the increase in optical density up to its maximum value. The subsequent decrease could be observed in all later experiments and with all substrates investigated and is probably to be attributed rather to the formation of secondary oxidation products.

Figure 2 shows how far the enzymatic oxidation of the fatty acids from sunflower seed oil depends on water activity. It can clearly be seen here that the reaction begins to work more and more slowly with decreasing r.h. After this initial phase the oxidation proceeds with all forms of water activity at approximately the same speed. Probably autoxidation plays an increasingly important part in these cases, especially with slight water activity, after hydroperoxides have accumulated in sufficiently large quantities for autocatalysis to start.

In an experiment carried out separately it was shown that the oxidation of the fatty acids did not stop even below 5 per cent r.h. There was, however, no acceleration in the enzyme catalysis with decreasing water activity as would have been expected for autoxidation.

The dependence on water activity was seen to be still more marked than with fatty acids when sunflower seed oil was used as substrate. As figure 3 shows, the presence of capillary water was not necessary here, either, for even with 5 per cent r.h. the lipid oxidation did not stop. Nevertheless, an increase in the water activity led to a considerable acceleration in the reaction. Part of the sample that had been kept at 5 per cent r.h. was brought into an atmosphere of 65 per cent r.h. and then the formation of the conjugated hydroperoxides increased sharply. If the observed enzyme activity, measured as the optical density at 234 nm after 60 hours is plotted against the corresponding atmospheric humidities, this dependence is shown with particular clarity (fig. 4). It can be seen here, particularly with intermediate water activities, that there is an almost linear dependence of the enzyme activity upon the r.h. On the r.h. axis there is noted the BET-point which is normally considered to be the lowest limit of enzyme activity in dry surroundings. Since the substrate can move of its own accord, some enzymatic lipid oxidation takes place even below this point.

Besides water activity the mode of substrate distribution also played an important part (fig. 5). On the one hand the whole of the cellulose was first impregnated with enzyme. After freeze drying, sunflower seed oil was added and by this means a homogeneous distribution was obtained. On the other hand the enzyme was put on one half of the cellulose and the substrate on the other, and only then were the two parts mixed in the dry state. This distribution was called " inhomogeneous ". Although now in both mixtures, seen as a whole, there was the same concentration of enzyme and substrate, the lipid oxidation proceeded at a considerable greater speed with homogeneous distribution. From this experiment the following conclusion can be drawn for practical application: In the production of mixed preparations which on the one hand contain enzyme active material that for reasons of technology or of nutrition and physiology cannot be rendered completely inactive but which are intended to be enriched with essential lipids, the best procedure is to mix the lipids with an uncritical constituent and ensure by this means an inhomogeneous distribution in the manufactured product.

It had already been established in an earlier piece of work (2) that lipolysis was accelerated in dry surroundings if at the same time phospholipids were present. We, too, had observed a similar effect concerning the enzymatic oxidation of sunflower seed oil in the presence of phospholipids from soya. At the same time

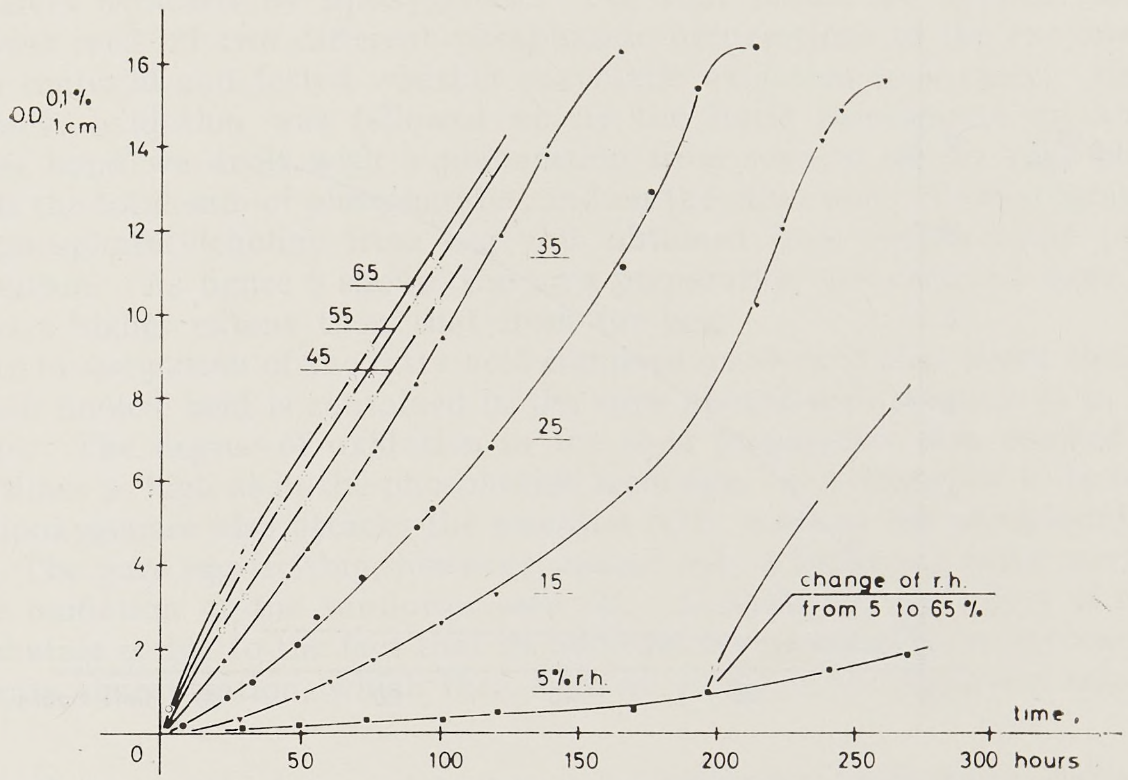


FIG. 3. — *Enzymic oxidation of sunflower seed oil at various relative humidities and 25 °C.*

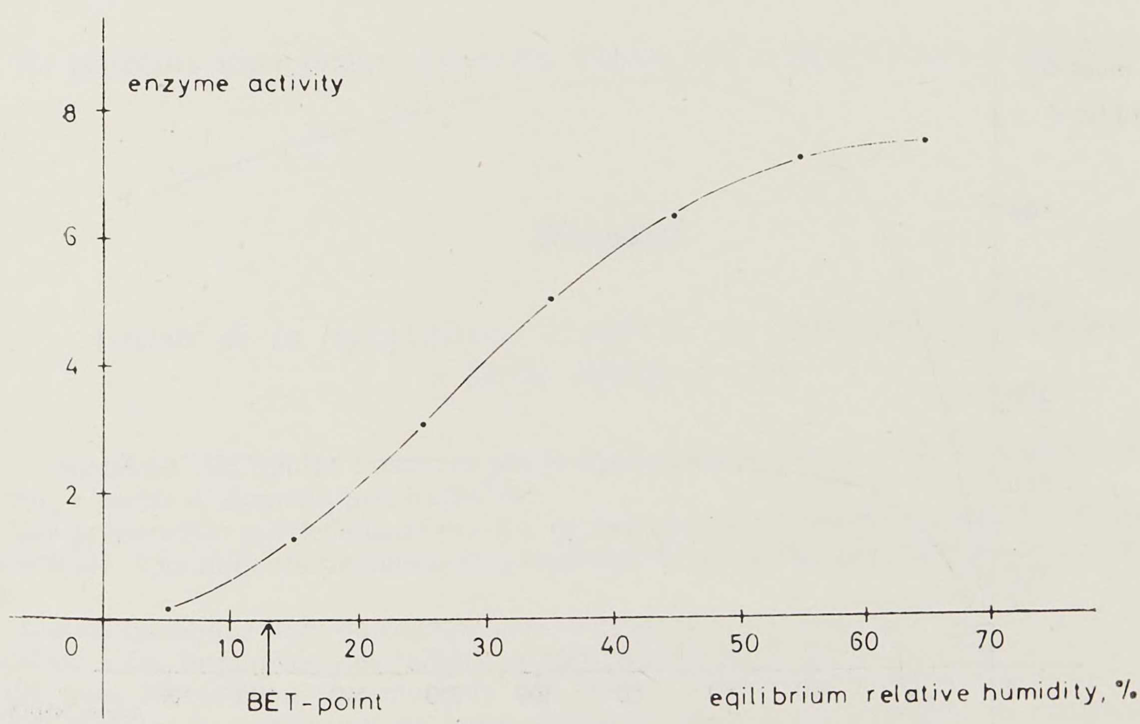


FIG. 4. — *Enzymic oxidation of sunflower seed oil: enzyme activity and equilibrium r.h. (enzyme activity measured as O.D.* $^{0,1\,\%}_{1\,cm}$ *at 234 nm after 60 hours).*

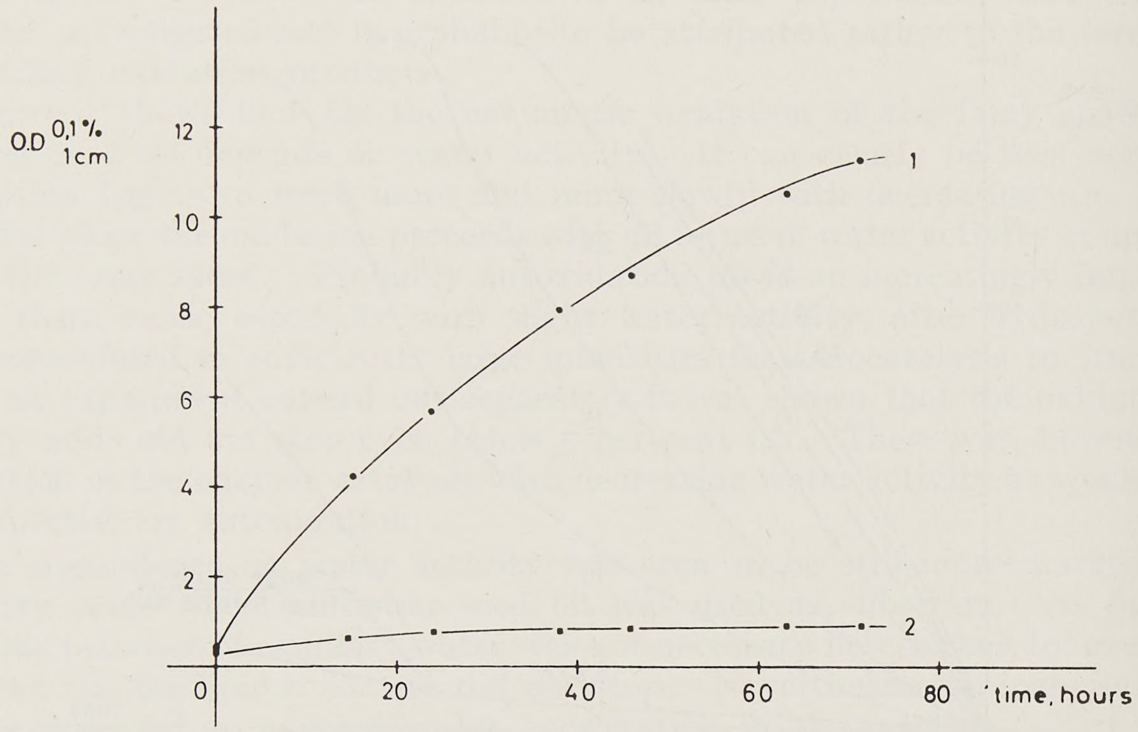


FIG. 5. — *Dependence of the enzymic oxidation of triglycerides on the mode substrate distribution: 1 : homogeneous, 2 : inhomogenous distribution.*

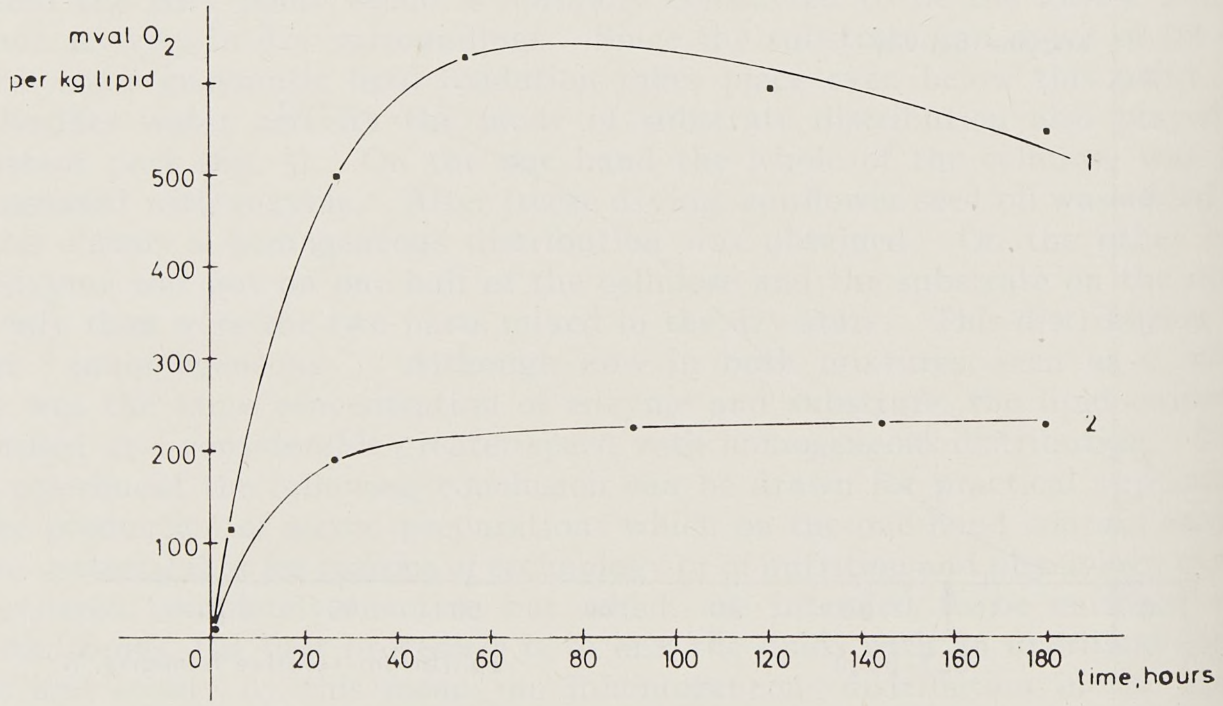


FIG. 6. — *Enzymic oxidation of phospholipids at 65 per cent rh. and 25 °C : 1 : phospholipids from soybeans ; 2 : phosphatidylcholine from egg yolk.*

it was not clear whether this result was due to the well-known lipid-liquefying effect or the surface active properties of the phospholipids, or whether they were themselves attacked by lipoxygenase. For that reason we applied instead of sunflower seed oil two different phosphatide preparations to the enzyme active carrier material and tested whether enzymatic oxidation took place. Here, the enzymatic oxidation was followed up by the ferric thiocyanate method. On the one hand we dealt with a preparation from soya of 98 per cent purity as regards the total sum of phosphatides, and on the other hand chromatographically pure phosphatidylcholine from egg yolk obtained from commercially produced egg lecithin. As figure 6 shows, the soya preparation was oxidized more rapidly and to a higher extent than that from the egg.

An investigation of the fatty acid composition showed that about three times as much linoleic acid is contained in the soya phosphatide mixture as in the egg lecithin. The degree of oxidation in the soya preparation also reached figures three times as high as in the phosphatide from egg. It is therefore to be assumed that lipoxygenase also attacks the essential fatty acids in the phosphatide molecule. The pure egg lecithin, however, caused only a relatively small acceleration in the oxidation of the sunflower seed oil. Accordingly, the effect of the soya phosphatide is due to the fact that its addition is equivalent to an increase in the substrate concentration, which then leads to a rise in the oxidation rate.

Reçu pour publication en mai 1977.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge « Fonds der Chemie » for supporting part of this work.

Résumé

Activité de la lipoxygénase et activité de l'eau dans les systèmes à faible teneur en eau

L'oxydation des lipides catalysée par la lipoxygénase a été étudiée en fonction de l'activité de l'eau, à partir d'aliments peu hydratés.

Une préparation partiellement purifiée de lipoxygénase du soja, exempte d'activité lipasique a été utilisée. Une huile de tournesol et le mélange de ses acides gras ont été utilisés comme substrats.

L'acide linoléique libre ou engagé dans les triglycérides est attaqué par l'enzyme. La réaction se produit à des humidités très faibles, ce qui indique ainsi que la présence d'eau n'est pas nécessaire pour l'oxydation enzymatique des lipides. D'autre part, l'augmentation de l'activité de l'eau accélère l'oxygénation de façon marquée. Ainsi la lipoxygénase se comporte dans les milieux peu hydratés de la même manière que d'autres enzymes. La relation entre le taux d'oxygénation et l'humidité relative est particulièrement nette lorsqu'on utilise les triglycérides comme substrats; elle est beaucoup moins nette avec les acides gras libres.

Quoi qu'il en soit l'activité de l'eau a des effets opposés sur l'oxygénation enzymatique et l'autoxydation.

Mots clés : Lipoxygénase du soja, teneur en eau.

Références

(1) ACKER L., 1969. Ernährungswiss. *Suppl.* **8**, 45.
(2) ACKER L., BEUTLER H. O., 1965. *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, **67**, 430.
(3) ACKER L., WIESE R., 1972. *Lebensmittel-Wiss. u. Technol.*, **5**, 181.
(4) BROCKMANN R. Über den Einfluss der Wasseraktivität und einiger Effektoren auf das Verhalten der Lipoxygenase im wasserarmen Milieu. *Dissertation* 1974, Münster, Germany.
(5) BROCKMANN R., ACKER L., 1977. *Lebensmittel-Wiss. u. Technol.* in press.

Ann. Technol. agric., 1977, **26** (2), 175-187.

On the mechanism of the reactions catalysed by plant lipoxygenases (*)

J. F. G. VLIEGENTHART and G. A. VELDINK

Laboratory of Organic Chemistry, University of Utrecht, Croesestraat 79, Utrecht, The Netherlands

Summary

The best investigated species is soybean lipoxygenase-1. It has a molecular weight of approx. 98.500, consists of a simple polypeptide chain. contains 1 gat Fe/mol and has a pH optimum of 9.0. The combination of enzyme with an equimolar amount of 13-L-hydroperoxy-9-cis, 11-trans-octadecadienoic acid (13L-ROOH) gives rise to the formation of a yellow enzymes species. The absorption fluorescence and e.p.r. spectra of this species differ significantly from the native enzyme. Concomitantly with the colour change, the hydroperoxide is converted. This reaction is irreversible. Only under anaerobic conditions the yellow enzyme can be reconverted into a colourless species by substrate fatty acid (linoleic acid). The addition of an excess of 13-L-ROOH to the yellow enzyme yields a purple enzyme species with quite different spectral characteristics. The purple enzyme species represents a complex between the yellow enzyme and 13-L-ROOH. This complex is rather labile at room temperature giving rise to the formation of the yellow enzyme under simultaneous isomerisation of 13-L-ROOH. The kinetics of the formation of the coloured enzyme species have been measured by stopped fow techniques. The results are significant for the role of these species in the reaction mechanism.

It has been found that also the pea lipoxygenase contains iron. Specific interactions between enzyme and hydroperoxide exist for the pea enzyme too.

Key-Words: Soybean-Pea, Lipoxygenase, Mechanism.

Introduction

Lipoxygenase has long been considered as a typical plant enzyme. In animal systems lipoxygenase was postulated as a part of the prostaglandin synthetase but, recently, another lipoxygenase type of enzyme has been isolated from blood platelets which does not seem to be associated with the prostaglandin synthetase (1, 2). From plant sources no new large scale isolations have been reported so most experiments are still carried out with lipoxygenase-1 from soybeans. The latter enzyme is relatively stable and can easily be obtained in large quantities.

(*) Présenté au Symposium International I.S.F., « Lipases et lipoxygénases d'origine végétale », Marseille 30 août-4 septembre 1976.

Dioxygenase reactions of lipoxygenase

In figure 1 the aerobic reaction of lipoxygenase with linoleic acid is shown. In general, polyunsaturated fatty acids with a 1,4-cis, cis-pentadiene system (3) can be utilized as a substrate by the enzyme. In the case of linoleic acid the formation of 13-L-hydroperoxylinoleic or 9-D-hydroperoxylinoleic acid occurs through the action of soybean and corn germ lipoxygenase respectively. Formally, the structural features of this reaction are:

i the removal of hydrogen from C-11 which as we could demonstrate (9) occurs stereospecifically and is the rate limiting step.
ii conjugation of the double bond system.
iii introduction of the hydroperoxy group.

$$\overset{13}{} \qquad \overset{11}{} \qquad \overset{9}{}$$
$$CH_3-(CH_2)_4-CH\overset{c}{=}CH-CH_2-CH\overset{c}{=}CH-(CH_2)_7-COOH$$

$$CH_3-(CH_2)_4-\underset{\displaystyle OOH}{\underset{|}{CH}}-CH\overset{t}{=}CH-CH\overset{c}{=}CH-(CH_2)_7-COOH$$

$$CH_3-(CH_2)_4-CH\overset{c}{=}CH-CH\overset{t}{=}CH-\underset{\displaystyle OOH}{\underset{|}{CH}}-(CH_2)_7-COOH$$

FIG. 1. — *Aerobic conversion of linoleic acid catalyzed by lipoxygenases.*

TABLE I

Metal analysis of soybean lipoxygenase-1

Fe	0.912	mole metal/mole enzyme
Cu	0.0018	
Mn	0.086	
Ca	0.21	
Mg	0.18	
Zn	0.03	
Co	—	
V	—	
Mo	—	
Ni	—	

The spin barrier between ground state (triplet) oxygen and linoleic acid has led Chan (8) to reinvestigate the enzyme with respect to the presence of transition metals. It was found that lipoxygenase contains 1-2 moles of iron per mole of enzyme. Subsequent investigations have confirmed the presence of iron in lipoxygenase in a 1:1 ratio (4, 5, 6). The occurrence of iron as a prosthetic group is not limited to soybean lipoxygenase since we could demonstrate its presence also in pea lipoxygenase. We confine ourselves now to soybean lipoxygenase-1 only. A more extensive metal analysis has recently been published by GALPIN et al. (7) (table 1). This enzyme was prepared with EDTA present throughout

the purification procedure in order to reduce the amount of contaminating metal-ions as far as possible. The protein was homogeneous on polyacrylamide gel electrophoresis and had the excellent specific activity of 280 μmol O_2/min/mg. Remarkably enough considerable quantities of divalent ions were detected which all together accounted for almost 1 gramatom. One might wonder whether this represents another metal-binding site or not. Recently, DIXON (15) has pointed out that a wide variety of enzymes which have a transition metal in the active centre, contain a second metal ion. For lipoxygenase this aspect needs further investigation.

The participation of neither free superoxide (O_2^-) nor singlet ($^1\Delta_g$) oxygen

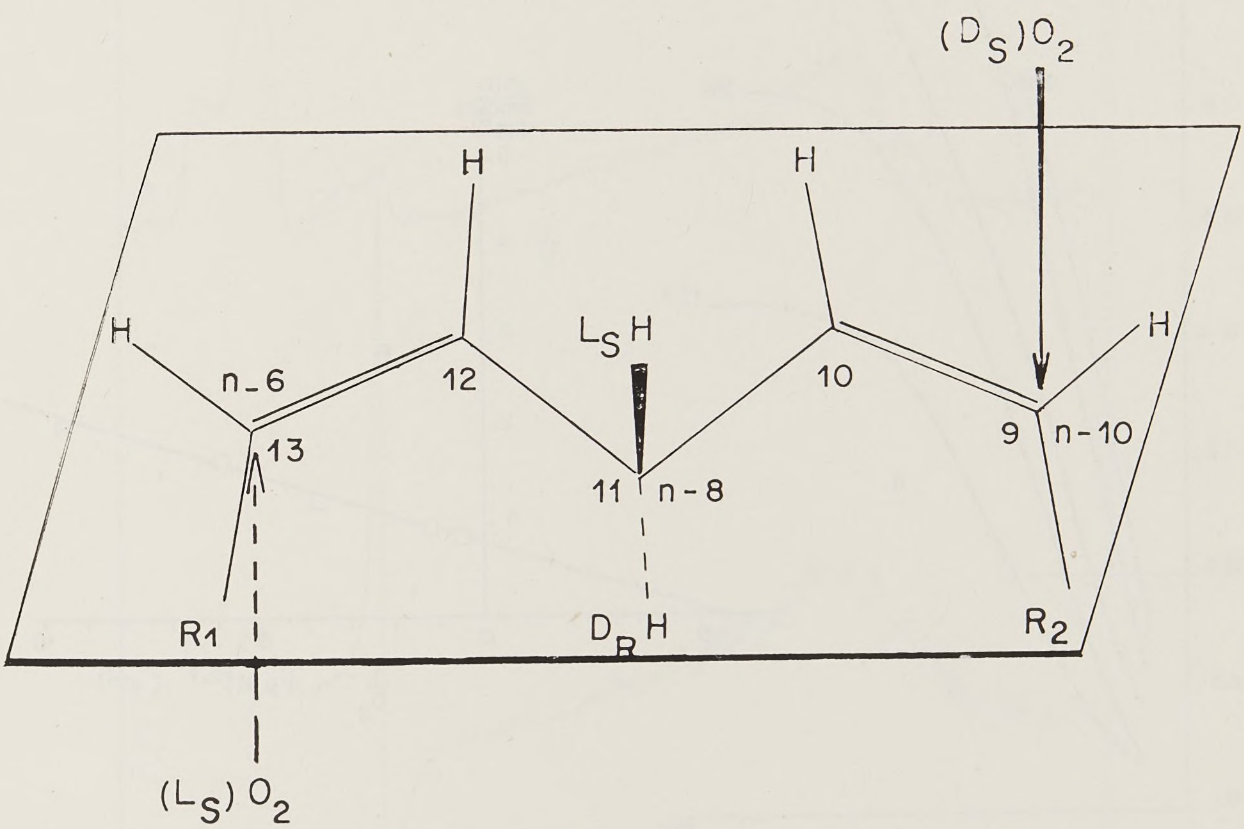


FIG. 2. — *Stereochemistry of hydrogen abstraction and oxygen insertion.*

in the formation of hydroperoxide seems likely. Addition of small amounts of superoxide dismutase to the incubation medium does not affect the rate of hydroperoxide formation. The addition of scavengers for singlet oxygen does not lead to reaction products which might be expected as a result from singlet oxygen reactions. These observations rule out the possibility that one of these free activated oxygen species play a role in the reaction. Moreover, if singlet oxygen were involved the strereochemistry of hydrogen removal and oxygen insertion requires that these processes occur at the same side of the planar pentadiene system (fig. 2). However, the reaction proceeds antarafacially (9). Nevertheless, the possibility that oxygen coordinated to iron has an activating effect cannot be excluded. We have, however, demonstrated that lipoxygenase can activate the fatty acid substrate by generating a fatty acid free radical (10) which would then be able to react directly with ground state oxygen.

Under certain conditions the reaction between linoleic acid and lipoxygenase shows a kinetic lag phase. The lag phase can be eliminated by adding the product 13-L-hydroperoxylinoleic acid. The addition of 9-D-hydroperoxylinoleic acid has no effect. This phenomenon has been interpreted as the result of a specific

interaction between enzyme and product. SMITH and LANDS (11) have proposed on the basis of kinetic measurements that the product hydroperoxide is a compulsory activator of lipoxygenase. However, the kinetic lag phase is a more complicated phenomenon as it is influenced by the concentrations of all reactants. EGMOND et al (17) have shown that at substrate concentrations below 25 μM no sigmoid initial velocity curves are observed. This holds also when the best precautions are taken to avoid contamination with hydroperoxides. The occurrence of a kinetic lag phase is then best explained by substrate inhibition. The

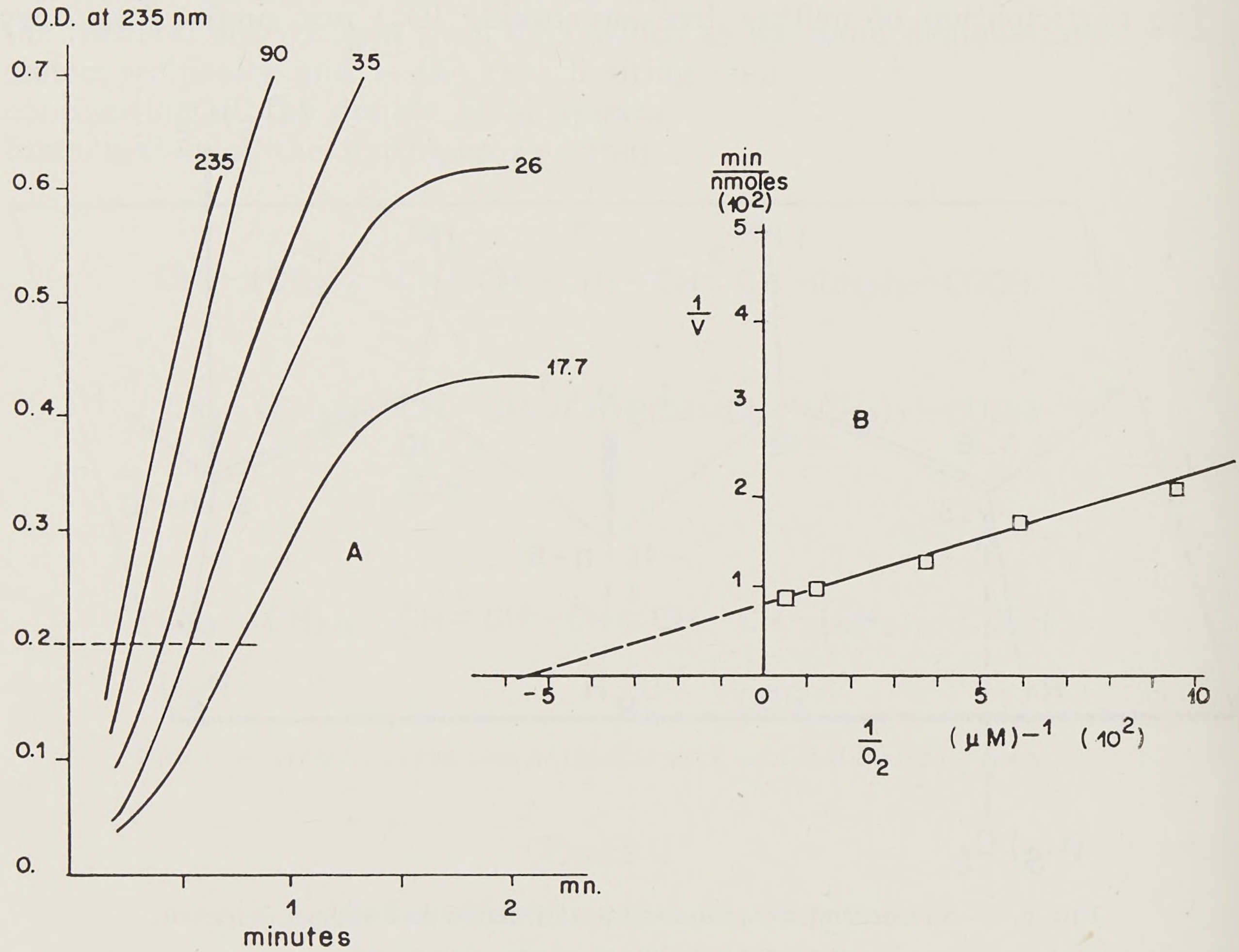


FIG. 3. — A. *Progress curves for the formation of hydroperoxylinoleic acid at various initial O_2 concentrations.*
B. *Double reciprocal plot of the reaction rates obtained from A at 8 μM ROOH and 32 μM linoleic acid vs. the corresponding O_2 concentration.*

concentration of the second substrate—oxygen—also affects the shape of the initial velocity curves as is shown in figure 3. At a fixed concentration of linoleate the curves have a more sigmoid shape at low oxygen concentration. Another factor which is likely to have a significant influence on the kinetics of this reaction is the physical state of the substrate i.e. the occurrence of micelles of linoleate and mixed micelles of linoleate and hydroperoxylinoleate.

Enzyme product interactions

Direct evidence for specific interactions between the enzyme and 13-L-hydroperoxylinoleic acid has been obtained from various spectroscopic studies. Electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy was applied to investigate the

interactions between the iron of the protein and product hydroperoxide (fig. 4). Spectrum A stems from the native enzyme and shows no significant resonances. Spectrum B was obtained by mixing equimolar amounts of enzyme and product hydroperoxide. The strong absorbance round $g = 6$ must be ascribed to high-

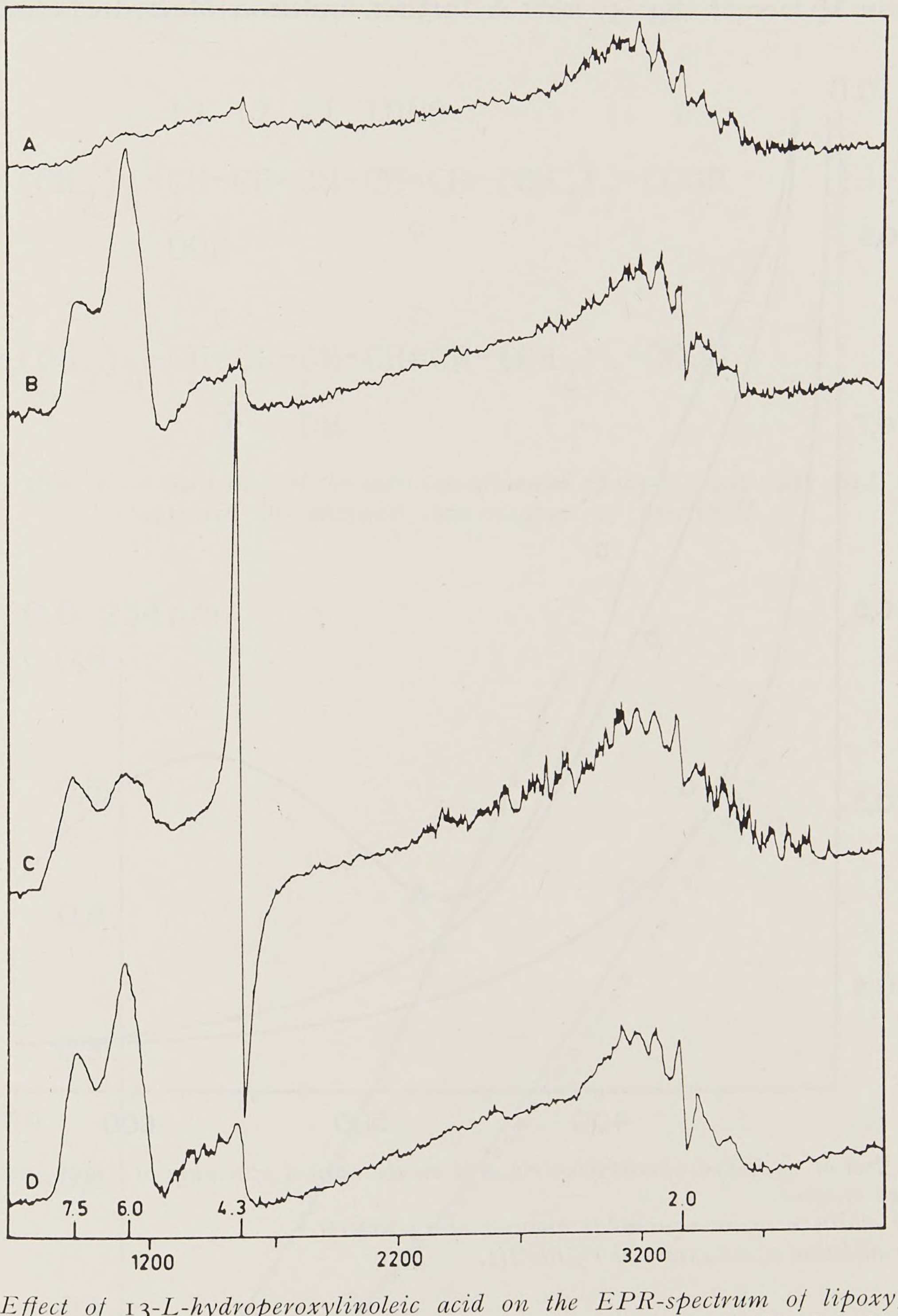


FIG. 4. — *Effect of 13-L-hydroperoxylinoleic acid on the EPR-spectrum of lipoxygenase. A : native enzyme; B : after addition of an equimolar amount of 13-ROOH; C : after addition of an excess of 13-ROOH; D : same as C after 1 h at 0 °C.*

spin Fe (III) in a ligand field of axial symmetry. On the addition of a molar excess of product hydroperoxide the absorbance shifts for the greater part to $g = 4.3$ (fig. 4, C). After 1 h at 0 °C the sample from which spectrum C was obtained gives spectrum D (at 15 °K) which is virtually identical to B. The latter process is reversible. Upon a new addition of product hydroperoxide, again spectrum C arises.

The effect of 13-hydroperoxylinoleic acid on the protein can also be demonstrated with optical spectrophotometry. Figure 5 shows a series of experiments quite similar to those just described with EPR-spectroscopy. The native enzyme (fig. 5, a) shows no specific features. However, upon addition of an equimolar amount of product hydroperoxide the colour of the solution turns into yellow (ε_{330} = 1 600 M^{-1} cm^{-1}, fig. 5, b). A further addition of hydroperoxide causes

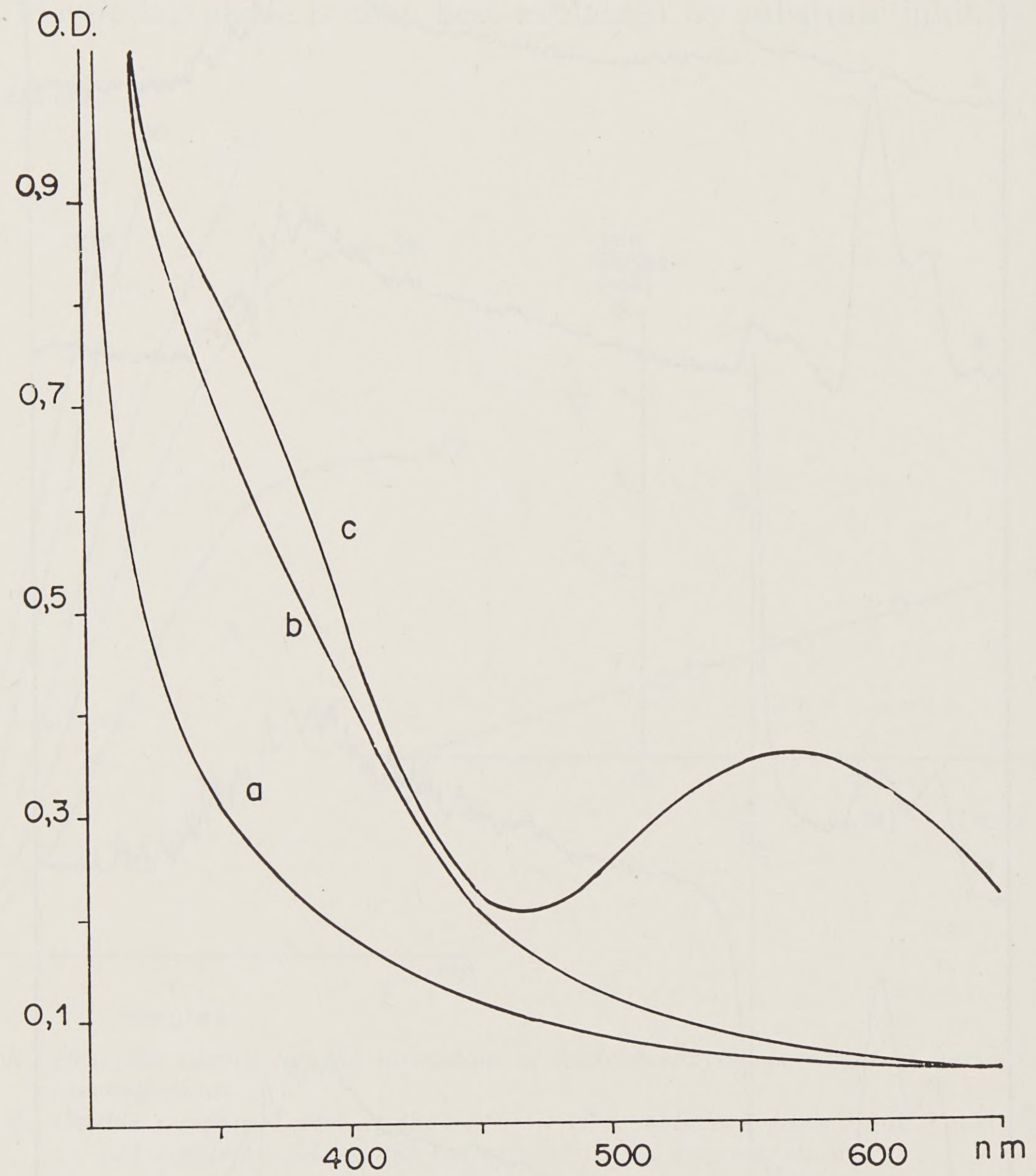


FIG. 5. — *Effect of 13-L-hydroperoxylinoleic acid on the optical spectrum of lipoxygenase.*
a: native enzyme.
b: after addition of an equimolar amount of 13-ROOH.
c: after addition of an excess of 13-ROOH.

the appearance of another chromophore at 580 nm. (ε_{580} = 1 200 $M^{-1}.cm^{-1}$, fig. 5, c) which disappears on standing and the spectrum of the solution becomes indistinguishable from b.

The effect of equimolar amounts of hydroperoxide has also been demonstrated by fluorescence spectrometry (6, 12). An excess of product hydroperoxide does not affect the fluorescence of the protein. The formation of the yellow enzyme species from the native enzyme and product hydroperoxide is a chemical reaction wherein the hydroperoxide is converted into products, which are not yet identified. The purple enzyme species represents a complex between the yellow enzyme and

hydroperoxide. The observed transition of the purple enzyme to the yellow species is accompanied by a conversion of 13-hydroperoxylinoleic acid into mono-unsaturated epoxy-hydroxy fatty acid (fig. 6). When this reaction is carried out with 13-L-hydroperoxy linoleic acid labelled with ^{18}O in the hydroperoxy group, the greater part of label is retained in both new oxygen functions. This suggests that this isomerization proceeds via free radicals in a cage reaction (18).

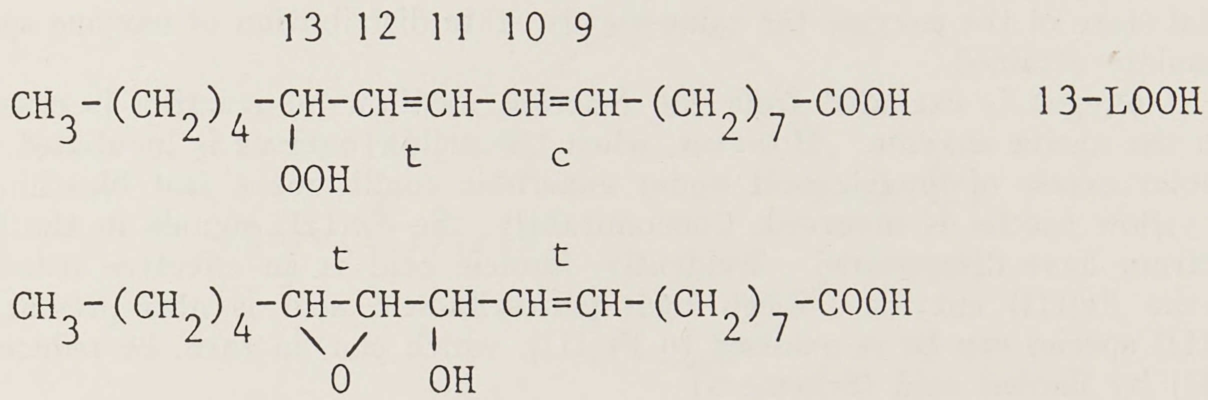


FIG. 6. — *Structure of the mono-unsaturated epoxy-hydroxy fatty acid obtained by enzymic isomerisation of 13-ROOH.*

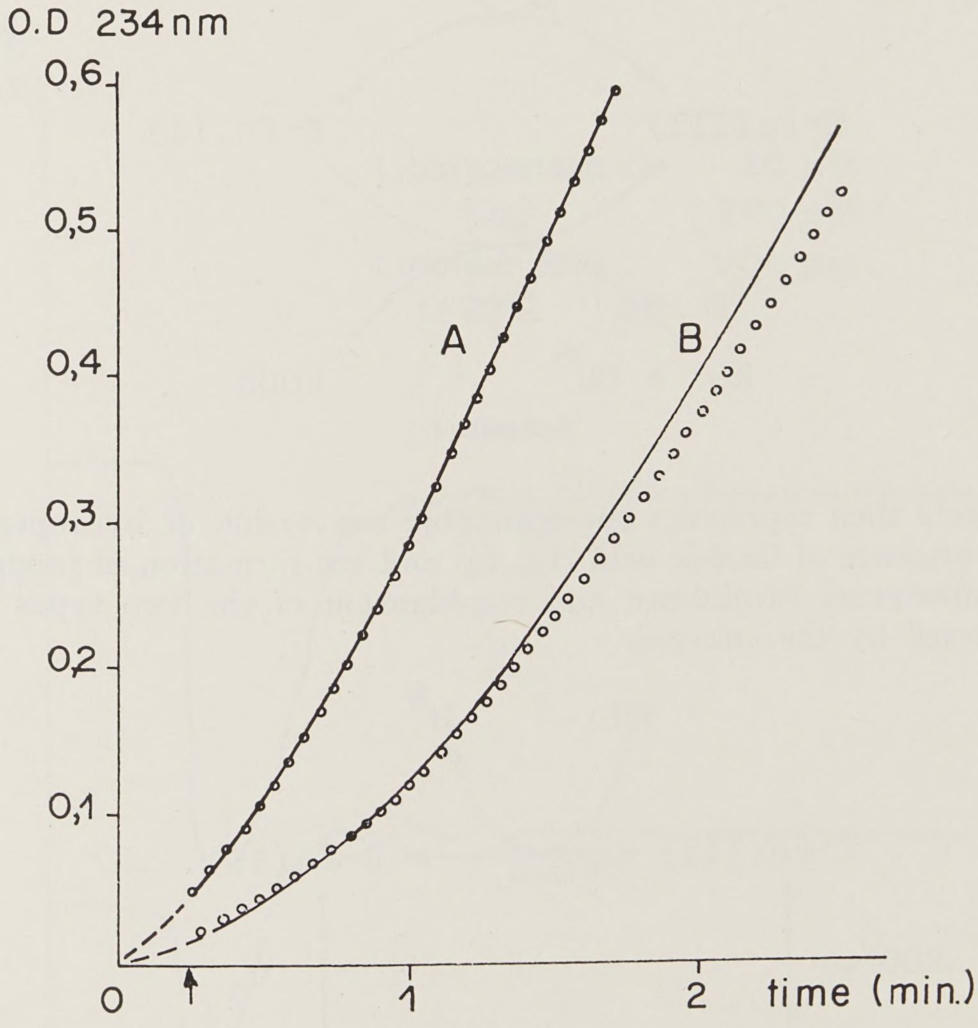
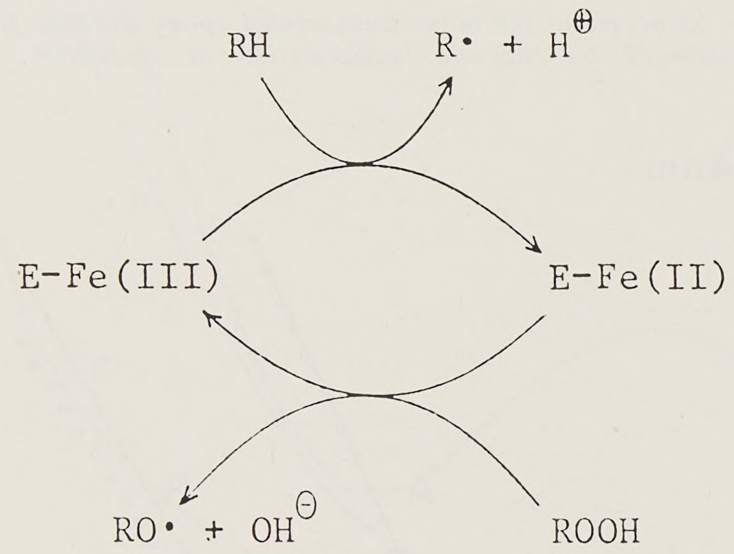


FIG. 7. — *Progress curves for the formation of 13-ROOH catalysed by native (——) and by yellow (oo) enzyme at two different substrate concentrations.*
A : 240 μ*M*.
B : 480 μ*M*.

Mechanism of lipoxygenase catalysis

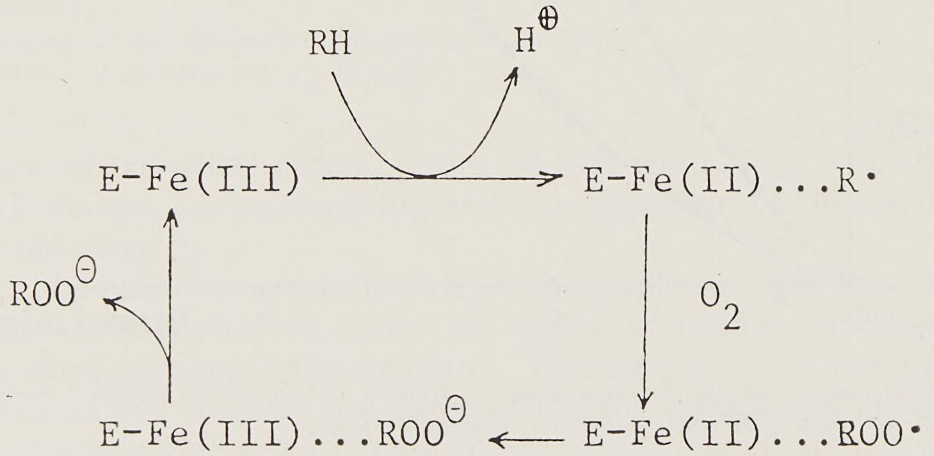
The presence of various enzyme species as detected by spectroscopic techniques raised the question as to which of these species is the active one during the oxygenation reaction. A comparison of the native and the yellow species in a standard assay at two substrate concentrations shows no significant differences (16) (fig. 7). This may be explained by assuming that, regardless of the initial state of the enzyme the same steady state distribution of enzyme species is rapidly attained.

If oxygen is excluded from the reaction medium no reaction is observed with the native enzyme. However, when the yellow enzyme is incubated with a molar excess of linoleic acid under anaerobic conditions a fast bleaching of the yellow species is observed. Concomitantly, the Fe(III) signals in the EPR spectrum have disappeared. Evidently, linoleic acid is an effective reductant for the Fe(III) enzyme. When hydroperoxylinoleic acid is also present the Fe(III) species can be re-oxidised to Fe(III), which can, in turn, be reduced to Fe(II) by linoleic acid (Scheme 1).



Scheme 1.

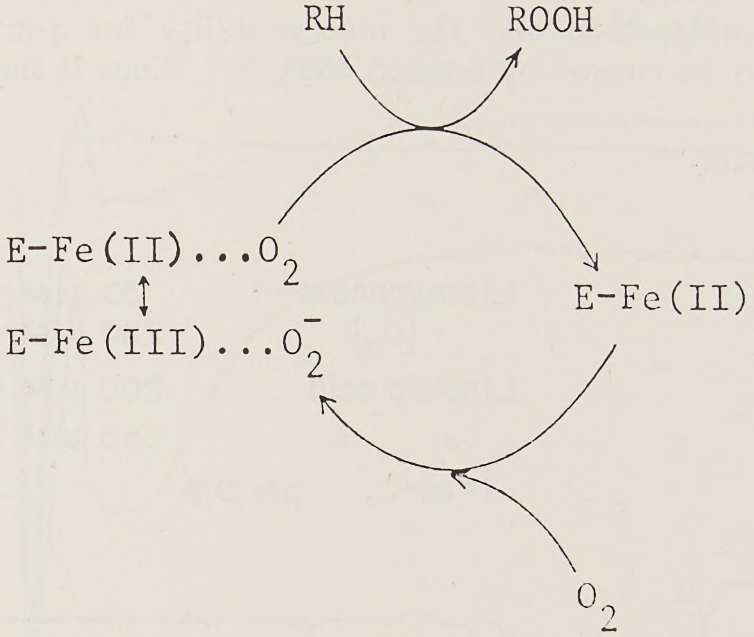
This cycle then represents the anaerobic conversion of hydroperoxylinoleic acid in the presence of linoleic acid (13, 14) and the formation of products resulting from subsequent breakdown and combination of the two types of radicals initially formed by the enzyme.



Scheme 2.

In the reaction of linoleic acid with molecular oxygen (fig. 1) the role of iron is very similar to the anaerobic case if it is assumed that iron occurs in a Fe(III) state (Scheme 2).

The involvement of a Fe(III)-species is demonstrated by the effect of 4-nitro-



SCHEME 3.

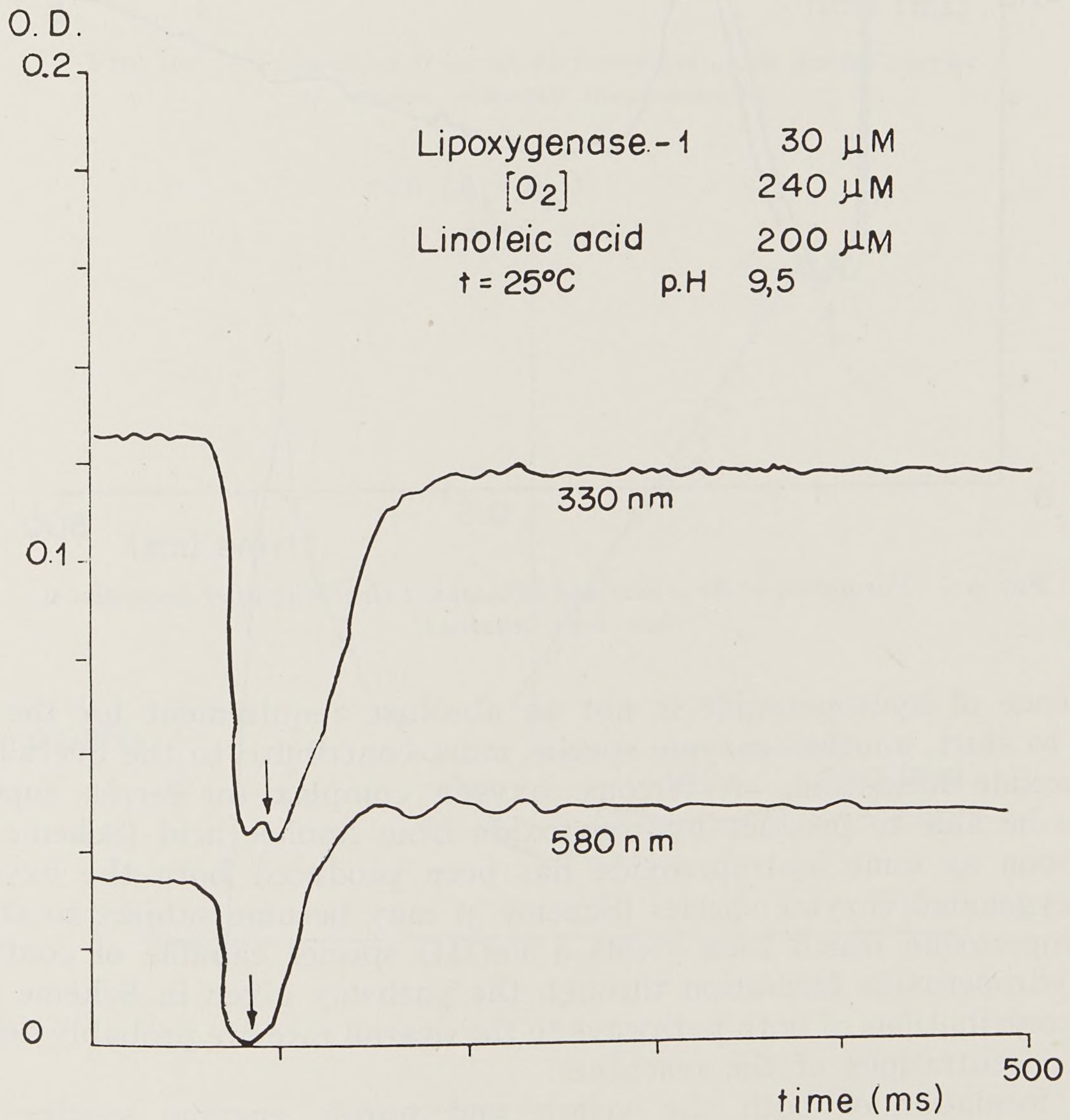


FIG. 8. — *Formation of yellow and purple enzyme species.*

catechol (7) which was found to inhibit the enzyme by binding to the ferric ion. However a preincubation of the native enzyme with this type of inhibitor does not result in a decrease in enzymic activity. This indicates that the native enzyme does not contain a ferric ion accessible for 4-nitrocatechol. Moreover the EPR studies show that the native enzyme is EPR-silent.

Both the diamagnetism and the inaccessibility for 4-nitrocatechol of the native species may be caused by bonded oxygen. Since it has been shown that

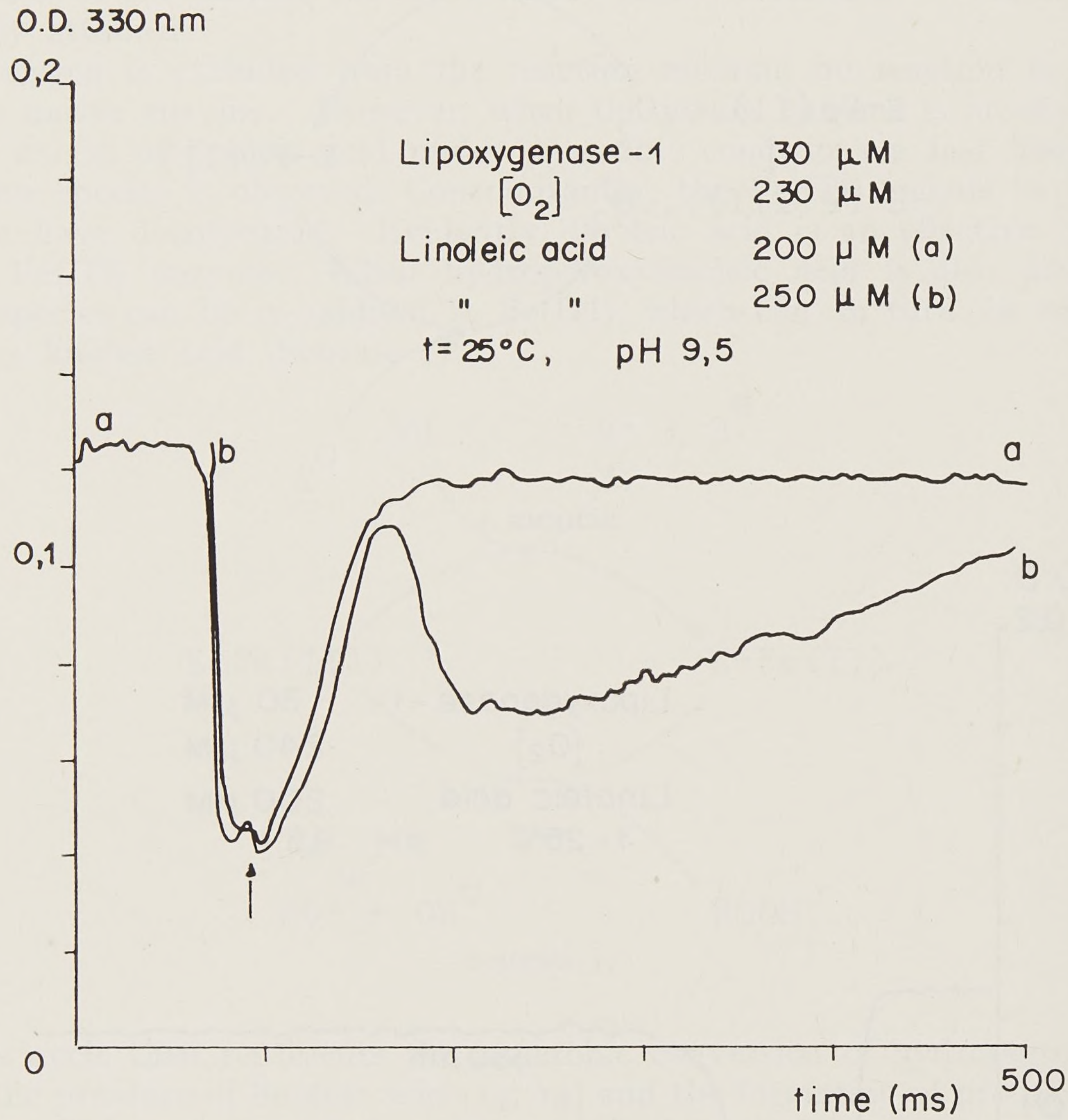


FIG. 9. — *Formation of the yellow and subsequent bleaching after anaerobiosis has been attained.*

the presence of hydroperoxide is not an absolute requirement for the aerobic reaction to start, another enzyme species must contribute to the overall rate of hydroperoxide formation. A ferrous: oxygen complex (or ferric: superoxide) may also be able to produce hydroperoxide from linoleic acid (Scheme 3).

As soon as some hydroperoxide has been produced both the oxygenated and deoxygenated enzyme species (Scheme 3) may become subject to attack by the hydroperoxide which then yields a Fe(III) species capable of contributing to the hydroperoxide formation through the pathway given in Scheme 2. The relative contributions of both pathways to the overall rate are probably dependent on the concentrations of the reactants.

The formation of both the yellow and purple enzyme species can be demonstrated by combining linoleic acid, oxygen and enzyme in a stopped flow

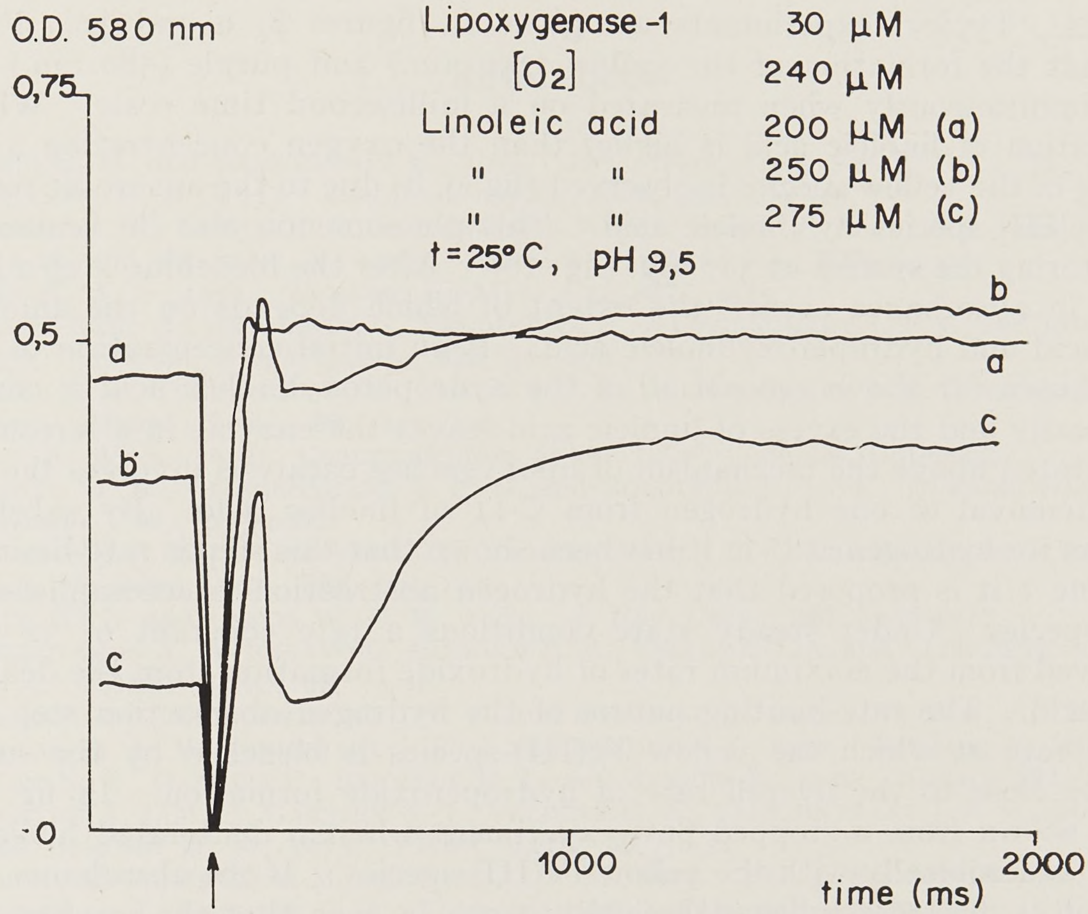


FIG. 10. — *Time dependence of the formation of the purple enzyme at various substrate concentrations.*

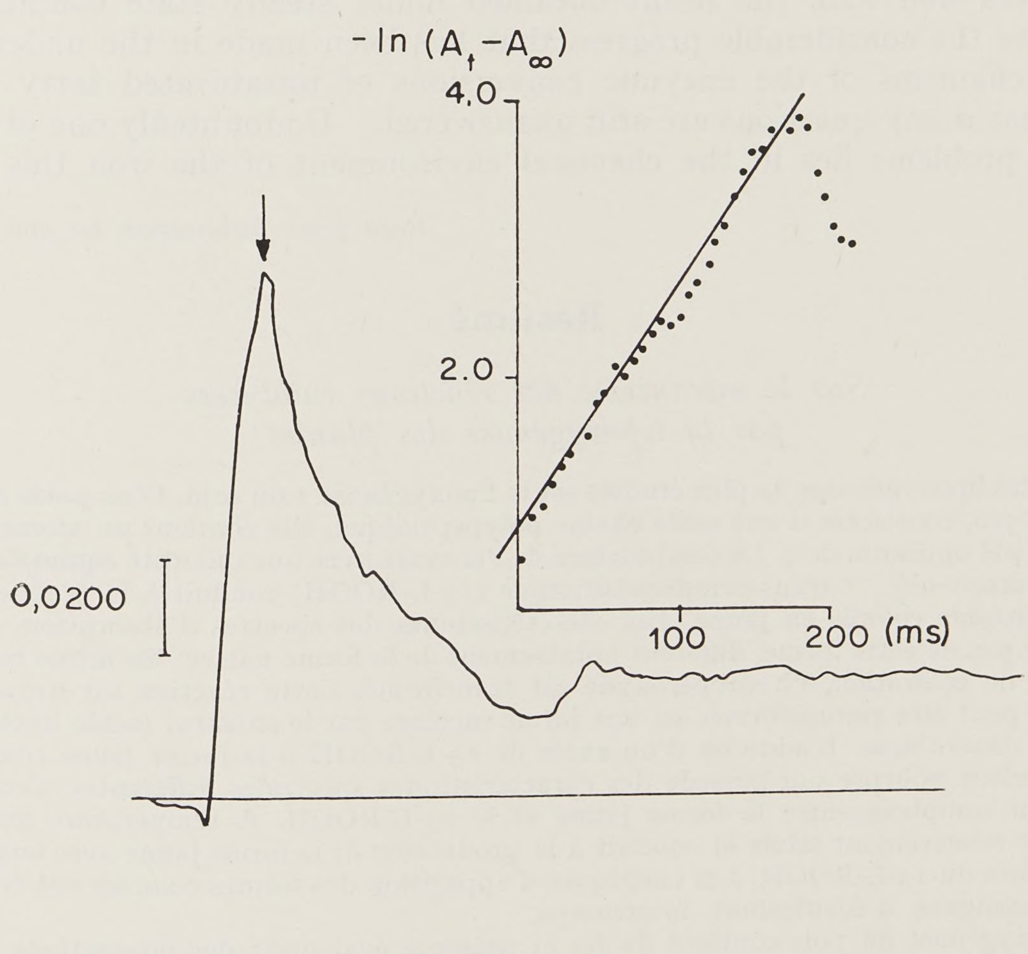


FIG. 11. — *Anaerobic bleaching of the yellow enzyme by deuterated linoleic acid.*

apparatus. Typical experiments are given in figures 8, 9 and 10. Figure 8 shows that the formation of the yellow (330 nm.) and purple (580 nm.) species occurs simultaneously when measured on a millisecond time scale. When the concentration of linoleic acid is higher than the oxygen concentration a partial bleaching of the yellow species is observed (fig. 9, b) due to the anaerobic reduction of the Fe(III)-species by linoleic acid. This phenomenon also be demonstrated by monitoring the system at 580 nm. (fig. 10). After the bleaching step a gradual increase in absorbance occurs, the extent of which depends on the amounts of linoleic acid and hydroperoxylinoleic acid. If an initial concentration of linoleic acid is chosen far above 240 μM all of the hydroperoxylinoleic acid is converted anaerobically and the excess of linoleic acid leaves the enzyme in a ferrous state.

As stated above the mechanism of lipoxygenase catalysis involves the stereospecific removal of one hydrogen from C-11 of linoleic acid. By substituting deuterium for hydrogen at C-11 it has been shown that this step is rate-limiting (9). In Scheme 1 it is proposed that the hydrogen abstraction is accomplished by a Fe(III)-species. Under steady state conditions a rate constant of $32 \pm 3\ s^{-1}$ was derived from the maximum rates of hydroxide formation from the deuterated linoleic acid. The rate-limiting nature of the hydrogen abstraction step implies that the rate at which the yellow Fe(III)-species is bleached by the substrate should be close to the overall rate of hydroperoxide formation. In fig. 11 the result is shown from a stopped-flow experiment wherein deuterated linoleic acid is mixed anaerobically with the yellow Fe(III)-species. If the absorbance change at 330 nm is plotted semilogarithmically it can be seen that the reaction follows pseudo first order kinetics between approx. 10 per cent and 75 per cent conversion. The rate constant derived from the first part of the plot is $30 \pm 1\ s^{-1}$ which agrees well with the result obtained under steady state conditions.

Despite the considerable progress that has been made in the understanding of the mechanisms of the enzymic conversions of unsaturated fatty acids by lipoxygenase many questions are still unanswered. Undoubtedly one of the most intriguing problems lies in the chemical environment of the iron this enzyme.

Reçu pour publication en mai 1977.

Résumé

Sur le mécanisme des réactions catalysées par la lipoxygénase des plantes

Parmi les lipoxygénases, la plus étudiée est la lipoxygénase 1 du soja. D'un poids moléculaire voisin de 98 500, constituée d'une seule chaîne polypeptidique, elle contient un atome de fer par mole et a un pH optimum de 9. La combinaison de l'enzyme avec une quantité équimolaire d'acide 13-L-hydroperoxy-9-6, 11-trans-octadécadiénoïque (13-L-ROOH) conduit à la production d'une forme de l'enzyme colorée en jaune. Les caractéristiques des spectres d'absorption, de fluorescence et de r.p.e. de cette forme, diffèrent notablement de la forme native. En même temps que le changement de coloration, l'hydroperoxyde est transformé. Cette réaction est irréversible. La forme jaune peut être retransformée en une forme incolore par le substrat (acide linoléique) uniquement en anaérobiose. L'addition d'un excès de 13-L-ROOH à la forme jaune conduit à une forme de couleur pourpre qui possède des caractéristiques spectrales différentes. Cette dernière forme est un complexe entre la forme jaune et le 13-L-ROOH. A température ambiante, ce complexe est relativement labile et conduit à la production de la forme jaune avec une isomérisation simultanée du 13-L-ROOH. Les cinétiques d'apparition des formes colorées ont été mesurées par des techniques d'écoulement interrompu.

La lipoxygénase du pois contient du fer et présente également des interactions spécifiques avec les hydroperoxydes.

Mots clés : Soja, lipoxygénase, mécanisme.

Références

(1) Hamberg M. and Samuelsson B., 1974. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (U.S.A.), **71**, 3400-3404.
(2) Nugteren D. H., 1975. *Biochim. Biophys. Acta*, **380**, 299-307.
(3) Holman R. T., Egwim P. O. and Christie W. W., 1969. *J. Biol. Chem.*, **244**, 1149-1151.
(4) Roza M. and Francke A., 1973. *Biochim. Biophys. Acta*, **327**, 24-31.
(5) Chan H. W. S., 1973. *Biochim. Biophys. Acta*, **327**, 32-35.
(6) Finazzi-Agrò A., Avigliano L., Veldink G. A., Vliegenthart J. F. G. and Boldingh J., 1973. *Biochim. Biophys. Acta*, **326**, 462-470.
(7) Galpin J. R., Tielens A. G. M., Veldink G. A., Vliegenthart J. F. G. and Boldingh J., 1976. FEBS. Lett., **69**, 179-182.
(8) Chan H. W. S., 1972. Communication at the I.S.F. Congress, Göteborg.
(9) Egmond M. R., Vliegenthart J. F. G. and Boldingh J., 1972. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **48**, 1055-1060.
(10) de Groot J. J. M. C., Garssen G. J., Vliegenthart J. F. G. and Boldingh J., 1973. *Biochim. Biophys. Acta*, **326**, 279-284.
(11) Smith W. L. and Lands W. E. M., 1972. *J. Biol. Chem.*, **247**, 1038-1047.
(12) Finazzi-Agrò A., Avigliano L., Egmond M. R., Veldink G. A. and Vliegenthart J. F. G., 1975. FEBS. Lett., **52**, 73-76.
(13) Garssen G. J., Vliegenthart J. F. G. and Boldingh J., 1971. *Biochem. J.*, **122**, 327-332.
(14) Garssen G. J., Vliegenthart J. F. G. and Boldingh J., 1972. *Biochem. J.*, **130**, 435-442.
(15) Dixon N. E., Gazzola C., Blakely R. L. and Zerner B., 1976. *Science*, **191**, 1144-1150.
(16) de Groot J. J. M. C., Garssen G. J., Veldink G. A., Vliegenthart J. F. G., Boldingh J. and Egmond M. R., 1975. FEBS Lett., **56**, 50-54.
(17) Egmond M. R., Brunori M. and Fasella P. M., 1976. *Eur. J. Biochem.*, **61**, 93-100.
(18) Garssen G. J., Veldink G. A., Vliegenthart J. F. G. and Boldingh J., 1976. *Eur. J. Biochem.*, **62**, 33-36.

Ann. Technol. agric., 1977, **26** (2), 189-198.

Transfert de métaux lourds dans la chaîne de panification (*)

R. BITTEL *, A. FOURCY **, B. GODON ***, G. MOURIOUX **

** Département de Protection,*
Commissariat à l'énergie atomique
BP N° 6, 92260 Fontenay-aux-Roses
*** Département de Recherche Fondamentale,*
Laboratoire de Biologie Végétale,
Centre d'Étude Nucléaire de Grenoble,
85 × 38041 Grenoble
**** Laboratoire de Biochimie des Aliments,*
Centre de Nantes, INRA
La Géraudière, 44072 Nantes Cedex

Résumé

Un premier travail a consisté à analyser l'influence de différents apports d'engrais en parcelles expérimentales sur la composition minérale du blé. Ensuite, deux chaînes alimentaires de panification ont été étudiées du point de vue du transfert de métaux lourds. La première chaîne allait de la farine au pain; l'autre chaîne comprenait le blé d'origine et aboutissait au pain en considérant les opérations de meunerie.

Il a été confirmé que les sons contiennent plus de minéraux que les farines : de 10 à 30 fois plus selon les métaux analysés. Si l'on compare la farine au blé, l'écart est moindre compte tenu des proportions en farine et son. La farine contient 2 à 4 fois moins de métaux lourds que le blé, pour un taux d'extraction de 72 p. 100.

Dans le pain, c'est la farine, malgré sa faible minéralisation, qui apporte l'essentiel des métaux analysés. Eau et levure en apportent peu en comparaison, mais il faut souligner que la levure qui ne représente, en poids, que le cinquantième de l'eau, est responsable du même apport que celle-ci.

Dans le pain fini, qui est légèrement plus humide que la farine (25 % d'humidité contre 15 %), les teneurs en métaux lourds sont voisines de celles de la farine. Il apparaît donc que l'opération la plus importante de la chaîne de panification du point de vue du transfert des métaux lourds est le blutage.

Mots clés : Blé, farine, panification, fumure, métaux lourds.

(*) Texte de la communication au 6e Meeting annuel de l'European Society of Nuclear methods in Agriculture, Cadarache, 8-13 septembre 1975, dans le cadre de recherches proposées par l'Association Communautés Européennes-C.E.A., n° 003-63-10 PSAF.

Introduction

Beaucoup d'études ont déjà été réalisées sur la composition minérale du blé, de la farine, ou du pain, le plus souvent en relation avec la variété ou les modes de culture (BAILEY, 1944; EL GINDY *et al.*, 1957). Le premier, CZERNIEJWSKI (1964) étudia les variations de teneurs minérales lors de la fabrication du pain. Les études ont alors concerné surtout les métaux indispensables à la vie (CHESCHEV et BAREIKO, 1971). Depuis, les travaux faits dans ce domaine considèrent les métaux lourds, principalement Hg, Pb et Cd, en relation avec les problèmes de pollution (THACHUK et KUZINA, 1972; LINNMAN, ANDERSON et NILLSON, 1974; HUISINGH, 1974).

En effet, les études de transfert des métaux lourds dans les chaînes alimentaires sont susceptibles de nous fournir deux types de renseignements : d'une part, les risques de contamination radioactive (les isotopes radioactifs étant absorbés et métabolisés au même titre que les isotopes stables, surtout pour Fe, Sr, Mn) et, d'autre part, les risques présentés en cas de pollution par des éléments chimiquement dangereux : Pb, Hg, Cd. L'influence de la fumure sur la composition minérale du grain de blé et le transfert de ces éléments au long de la chaîne de panification sont d'un intérêt évident du fait de la grande consommation de pain dans certains pays.

Matériel

1. — *Matériel végétal utilisé*

L'étude des blés cultivés sur des parcelles ayant reçu différents traitements a porté sur des échantillons fournis par le Pr R. MOREL de l'I.N.A. Paris-Grignon. Cinq séries d'échantillons, chacune cultivée sur une parcelle différente ont été examinées. Pour chaque échantillon nous avons préparé au laboratoire de l'I.N.R.A. trois produits sur un moulin d'essais Buhler : farines, sons, remoulages.

Le blé est de la variété « Champlein ». Les parcelles ont reçu les traitements suivants :

1 : fumier de ferme seul, depuis 1929;
2 : sans engrais minéraux depuis 1902;
3 : avec engrais P et K depuis 1929;
4 : avec engrais N et P depuis 1929;
5 : sans fumier ni engrais de 1902 à 1967 suivi d'apport d'engrais minéraux N, P, K depuis 1967.

2. — *Produits intermédiaires et produits finis*

L'étude du transfert des minéraux dans la chaîne blé-pain a porté sur deux séries d'échantillons. L'une (chaîne I) va du blé provenant de parcelles expérimentales jusqu'aux pains, produits dans le fournil d'essai de l'I.N.R.A. Elle comprend les éléments suivants : blé brut, blé propre, deux farines (l'une provenant surtout du centre de l'amande, à granulation fine, l'autre d'origine plus périphérique et à granulation plus grosse), sons et remoulages (refus de blutage),

sel, levure, eau et deux échantillons de pain, l'un cuit en zone chaude du four, l'autre cuit en zone plus froide. L'autre chaîne part d'une farine industrielle pour aboutir au pain obtenu dans un fournil de boulanger. Elle comporte les éléments suivants : farine, eau, levure, lockerine (améliorant de panification à base de lécithine, de malt et d'acide ascorbique), sel, deux échantillons de pâte (l'un prélevé juste après le malaxage et l'autre en fin de pétrissage), pain de 450 g et pain de 100 g.

Pour le transport jusqu'à Grenoble et ensuite pour le stockage, les échantillons ont été placés dans des flacons de polyéthylène, spécialement traités au préalable : lavés à l'eau permutée, ils sont laissés en contact avec HNO_3 très pur, 2N, pendant 24 heures, afin de provoquer la désorption de la plupart des ions, puis ils sont ensuite rincés à l'eau bidistillée et séchés. A l'arrivée à Grenoble, les échantillons ont été entreposés dans une chambre froide à 4 °C.

a. — *Opérations de meunerie :*

Le blé brut est nettoyé par passage sur différents tamis, ce qui permet d'éliminer les grains cassés et les substances étrangères (glumes, etc.). Dans la chaîne I, pour 100 de blé brut (en poids), on trouve 96 de blé propre et 4 d'impuretés.

Le blé propre est ensuite broyé lors de passages successifs entre des cylindres. Après chaque passage, la farine est blutée sur des tamis; on la sépare ainsi des parties cellulosiques périphériques du grain qui constituent les issues de meunerie. Un premier broyage élimine les sons, qui correspondent à l'extérieur de l'enveloppe du caryopse. Un second broyage sépare les remoulages, qui sont les parties internes de l'enveloppe.

Pondéralement, les proportions sont les suivantes :
Pour 100 g de blé, on récupère : 72-72 g de farine;
17-19 g de sons;
8- 9 g de remoulages.

Les pertes durant ces opérations sont de 1 à 2 p. 100.

b. — *Opérations de boulangerie :*

Les pâtes sont constituées par l'addition à 100 grammes de farine des quantités suivantes (en g) d'eau, de sel, de levure et de lockerine; chaîne I : 55,5; 2,2; 2,0; 0 et chaîne II : 66,6; 2,0; 1,7; 0,9. Le mélange est pétri pendant environ 20 min; puis on laisse fermenter la pâte pendant 1 h 30 min : c'est le pointage. Après division de la pâte, les pâtons sont façonnés, déposés dans des pannetons et soumis à une seconde fermentation de 45 à 60 min (l'apprêt). La cuisson a lieu dans un four chauffé à 250 °C en présence de vapeur d'eau. Les temps de cuisson varient selon la grosseur des pains entre 10 et 22 minutes.

Méthodes d'analyse

En raison de la rapidité d'exécution et de l'amélioration des performances, notamment des limites de détection, nous avons choisi l'analyse par spectrographie d'absorption atomique pour la plupart des éléments. Par contre, nous avons retenu l'analyse par activation pour le mercure. Les prélèvements pour minéralisation ou pour activation ont toujours été faits à partir d'échantillons séchés. Le degré d'humidité de chaque produit a été déterminé dès réception des échantillons, ce qui a permis d'exprimer les teneurs des différents éléments en fonction du poids frais.

1. — *Spectrographie d'absorption atomique*

L'appareil utilisé est un Varian Techtron AA6, avec un four Techtron modèle 63. Les prises d'échantillons, de l'ordre de 100 à 500 mg de produits homogénéisés, sont mises en solution dans 5 à 10 ml d'HNO_3 concentré et très pur. La durée de l'attaque à ébullition varie de 6 à 10 heures, suivant la nature du produit. Le minéralisat est ramené à un volume de 10 à 20 ml. Lors de l'utilisation du four, les quantités introduites sont de 5 à 10 µl.

Dans l'expression des résultats, il a été tenu compte de plusieurs paramètres mesurables :

— effets inter-éléments dans l'échantillon;
— effets de sels (charge saline);
— absorption non spécifique.

Les sensibilités obtenues dans les meilleures conditions sont de l'ordre de 0,05 ppm. La dispersion des résultats est de l'ordre de ± 10 p. 100. Les longueurs d'onde utilisées figurent dans le tableau 1.

TABLEAU I

Longueurs d'onde utilisées pour les mesures de spectrographie d'absorption atomique

Éléments	Longueurs d'onde
Zn	213,8 nm
Pb	217 nm
Cu	217,9 nm
Cd	228,8 nm
Ni	232 nm
Co	240,7 nm
Mg	285,2 nm
Mo	313,3 nm
Fe	372 nm
Sr	460,7 nm

2. — *Analyse par activation*

Les échantillons (100 à 200 mg) sont irradiés en ampoules de quartz scellées (longueur 6 cm, diamètre intérieur 0,5 cm, épaisseur de la paroi 0,2 cm) dans la pile-piscine Mélusine. L'activation dure de 16 à 20 heures au flux de 10^{13} neutrons s^{-1} cm^{-2}. Le temps de refroidissement est d'environ 24 heures. Un étalon est irradié en même temps que l'échantillon.

Les caractéristiques sont :

— élément Hg,
— réaction utilisée ^{196}Hg (n, γ) ^{197}Hg,
— isotopique 0,146,
— section efficace (barns) 880,
— période du corps 65 h,
— émission 0,077 Mev.

TABLEAU 2

Analyse de blé provenant de parcelles expérimentales avec ou sans engrais

		P (mg/g)	K (mg/g)	Ca (mg/g)	Mg (mg/g)	Mn (ppm)	Zn (ppm)	Fe (ppm)	Cu (ppm)	Cr (ppm)	Cd (ppm)	Ni (ppm)	Pb (ppm)
	Farine	1,2	1	0,4	0,13	6,1	6,5	17	2,4	0,06	↑	↑	↑
1	Remoulages	9,3	8,2	1,2	2,34	181	90	75	2,4	0,13			
(*fumier*	Sons	14,6	13,1	1,4	4,57	184	100	111	3,3	0,07			
de ferme)	Blé	4,3	3,8	0,7	1,13	52	30	39	2,5	0,07			
	Farine	0,9	1,3	0,4	0,13	5,8	10	15	2,2	0,06			
2	Remoulages	9,6	8,3	1,2	2,1	169	85	75	3,2	0,1			
(*rien*)	Sons	16	13,3	1,6	4,4	180	100	93	4	0,08			
	Blé	4,4	4,1	0,7	1,1	51	32,5	34,3	2,6	0,07			
	Farine	1,2	1	0,4	0,15	5,7	19,5	11	2	0,06			
3	Remoulages	10,3	9,2	1,3	2,5	186	101	81	2,7	0,14	< 0,5	< 5	< 0,3
(*P K*)	Sons	16,6	13,4	1,4	4,7	175	113	90	2,8	0,09			
	Blé	4,8	4	0,7	1,2	51	43	31	2,2	0,07			
	Farine	1,1	1,3	0,5	0,15	6	6,3	11	2	0,03			
4	Remoulages	9,1	8,5	2	2,4	182	76	87	2,6	0,09			
(*N P*)	Sons	13,5	11,9	2,3	4,8	192	80	90	3,2	0,1			
	Blé	4,2	4	0,9	0,12	56	53	32,1	2,4	0,05			
	Farine	1,2	1,2	0,4	0,13	4,3	4,8	7	1,3	0,03			
5	Remoulages	7,9	7,9	1,3	2,1	163	66	72	2,6	0,07			
(*N P K*)	Sons	13,2	13	1,5	4,1	168	73	90	3	0,08			
	Blé	4,1	4	0,7	1,1	49	46	29	1,7	0,04	↓	↓	↓

Après bris de l'ampoule activée, la minéralisation s'effectue par attaque sulfo-nitrique, en présence d'une quantité exactement connue de mercure entraîneur. Le mercure est ensuite précipité à l'état métallique puis purifié par distillation. Le rendement de ces opérations est calculé à partir du poids de mercure entraîneur récupéré (FOURCY et coll., 1972).

Les comptages sont effectués sur détecteur NaI. La quantité de mercure est calculée par comparaison avec l'étalon correspondant. La sensibilité est de l'ordre de 1/100 ppm.

3. — *Autres méthodes*

K et Ca sont dosés après minéralisation par spectrométrie d'émission, sur un appareil Flammenphotometer EPPENDORF.

P est déterminé à l'aide de la méthode colorimétrique (VARLEY, 1966).

Résultats

1. — *Analyse du blé cultivé sur des parcelles expérimentales*

Les résultats sont regroupés dans le tableau 2. Contrairement à ce qu'on aurait pu attendre, il n'apparaît pas de répercussion sensible de ces traitements sur la composition minérale du grain de blé. Il faut remarquer que le grain est un organe de réserves et que des différences au niveau de la nutrition minérale de la plante peuvent ne pas être répercutées dans la composition minérale du grain. Ceci est cependant indépendant du rendement de la culture.

2. — *Transfert des métaux lourds dans la chaîne blé-farine-pain*

Les résultats regroupés dans les tableaux 3 et 4 appellent les commentaires suivants.

Nous trouvons, dans les deux chaînes, des teneurs comparables pour les différents éléments étudiés. Pour le blé, comme on le sait, les plus fortes teneurs se trouvent dans les parties externes du caryopse, c'est-à-dire les sons et remoulages. La farine est elle-même assez peu minéralisée. Les teneurs du pain sont, en gros, équivalentes à celles de la farine : les apports minéraux dus à la levure, au sel et à l'eau sont compensés par une plus forte teneur en eau du pain (tabl. 4). Il est à noter que la levure, qui ne représente environ que le 1/30 du poids de l'eau, est responsable d'un apport minéral équivalent. Les bilans sont groupés dans les tableaux 5 et 6. On constate qu'une grande partie des minéraux est éliminée avec les sons et les remoulages lors de l'opération de blutage.

Conclusion

La chaîne de panification diffère sensiblement d'autres chaînes technologiques comme celles de la vinification, de la brasserie et de la laiterie (BRUANT-SAUGY, 1972; BRUANT, 1974). En effet, elle ne comporte pas d'opération de séparation

TABLEAU 3

Teneurs en minéraux des échantillons de la chaîne I. — Résultats en ppm ± 10 % *(poids frais)*

	Mg	Zn	Fe	Cu	Cd	Sr	Pb	Co	Mo	Hg (ppb)
Blé brut	944	21	35	4,5	0,7	0,35	0,5			130
Blé propre	893	22	41	5	1,3	0,45	0,6			130
Sons	3 425	66	91	13	1	3,5	0,7			300
Remoulages	1 866	64	114	10,5	7	2,8	0,5			180
Farine I	151	8	16	3	1,2	0,35	0,2			55
Farine II	151	8	14	3	0,80	0,7	0,35	< 0,005	< 0,1	65
Levure	255	51	13,4	2,5	0,7	0,6	0,4			15
Eau	4	< 0,5	< 0,2	< 0,6	< 0,2	0,3	< 0,02			18
Sel	30	1	1,5	8						
Pain Z F.	95	6	19	4	0,75	0,25	0,9			110
Pain Z C.	128	7	26	4	0,75	0,25	0,45			100

TABLEAU 4

Teneurs en minéraux des différents échantillons de la chaîne II. — Résultats en ppm ± 10 % *(poids frais)*

	Mg	Fe	Zn	Cu	Cd	Sr	Pb	Co	Mo	H (ppb)
Farine	137	16	9	4,1	0,6	0,6	0,64			
Lackrine	245	22	14	4,6	0,7	6	0,74			120
Levure	159	13,3	38	3	0,3	1,3	0,30			25
Eau	4,5	< 0,2	< 0,5	0,5	0,02	3	0,07			15
Pâte I	104	8,7	7,6	2,8	0,4	2	0,4	< 0,01	< 0,2	60
Pâte II	98	8,1	7,4	2,7	0,4	1,2	0,6			75
Pain de 400 g	110	15,7	7,5	2,2	1	0,6	0,8			90
Pain de 100 g	132	16	8	1,8	0,8	0,3	0,9			120
Sel	4	2	1	7						

TABLEAU 5

Bilan du transfert minéral dans la chaîne I
(Valeurs en µg)

	Σ matières premières	Pain	Δ Pain-Σ	Δ % du pain
Mg. . . .	15 898	15 360	— 538	— 3,5
Zn. . . .	906	840	— 66	— 8
Fe. . . .	1 541	2 400	+ 859	+ 36
Cu. . . .	353	480	+ 127	+ 26
Cd. . . .	106	96	— 16	— 17
Sr	30	52	+ 22	+ 42 n.s.
Pb. . . .	84	32	— 50	+ 156 n.s.

TABLEAU 6

Bilan du transfert minéral dans la chaîne II
(Valeurs en µg)

	Σ matières premières	Pain		Δ Pain-Σ		Δ % du pain	
		100	400	100	400	100	400
Mg. . . .	14 498	15 290	15 048	+ 792	+ 550	+ 5	+ 4
Zn. . . .	1 003	1 042	912	+ 39	— 91	+ 4	— 10
Fe. . . .	1 655	1 824	2 182	+ 169	+ 527	+ 9	+ 24
Cu. . . .	352	305	205	— 47	— 145	— 15	— 71
Cd. . . .	62	139	92	+ 77	+ 30	+ 55	+ 33
Pb. . . .	70	102	110	+ 32	+ 40	+ 31	+ 36

importante des minéraux comme peut l'être la clarification d'un jus. Il n'y a pas non plus l'effet d'écran dû au passage à travers un organisme animal.

Seule la séparation des sons entraîne hors de la chaîne alimentaire de l'homme une quantité notable de métaux. En effet, les sons sont dix à trente fois plus riches en minéraux que les farines. La farine contient deux à quatre fois moins de métaux lourds que le blé, pour un taux d'extraction de 72 p. 100. Ceci montre l'importance d'un blutage suffisant pour limiter la quantité des métaux lourds dans les produits de mouture. Or, dans le pain, c'est la farine, malgré sa faible minéralisation, qui apporte l'essentiel des métaux analysés. Eau et levure en apportent peu en comparaison, mais il faut souligner que la levure, qui ne représente en poids que le trentième de l'eau, est responsable du même apport que celle-ci. Dans le pain fini, qui est légèrement plus humide que la farine — 25 p. 100 d'humidité contre 15 p. 100 — les teneurs en métaux lourds sont voisines de celles de la farine. Il apparaît donc que l'opération la plus importante de la chaîne de panification, du point de vue transfert des métaux lourds, est le blutage.

En ce qui concerne l'analyse de blé Champlein, cultivé sur des parcelles

expérimentales, les analyses faites soulignent la faible variabilité de la composition minérale du grain de blé. En effet, l'expérience des parcelles de Grignon est assez exceptionnelle puisqu'elle remonte à 1902. Entre les parcelles sans engrais et les parcelles ayant reçu une fumure complète, les résultats d'analyse sont extrêmement voisins, y compris pour les éléments P et K.

Reçu pour publication en mai 1977.

Remerciements

Les analyses par absorption atomique ont été exécutées par le Service de Chimie Analytique de Grenoble.

Nous remercions MM. HUART et DISANT de leur collaboration.

Nous remercions M. R. MOREL, Professeur à l'I.N.A. de Paris-Grignon, qui nous a fourni les blés en provenance de parcelles contrôlées.

Summary

Transfer of heavy metals in the baking chain

In a first step, the influence of different fertilizers levels in experimental fields on wheat mineral composition was analysed. Then, two baking chains regarding heavy metals transfer were studied, one from flour to bread, the other from the original wheat to the finished bread, including milling process.

Concerning metals determination, the bran content appears to be 10 to 30 times higher than for flour, when that of flour is 2 to 4 times less than in the original wheat, for an extraction rate of 72 per cent.

In bread, most of the checked heavy metals originate from flour, when those brought by water and yeast are small. Nevertheless, yeast brings as much metals as water, though it accounts only for 1/50 of the water weight.

Bread and flour have rather similar amounts in heavy metals, when their water content are 25 ans 15 per cent respectively.

So, sifting in the milling process appears the most important step which subordinates the heavy metal transfer in the baking chain.

Key-Words: Wheat, flour, panification, manuring, heavy metals.

Références bibliographiques

BAILEY C. H., 1944. The constituents of wheat and wheat products. REINHOLD, New-York.

BRUANT-SAUGY C., 1972. Étude de quelques éléments d'intérêt écologique dans la chaîne herbe-produits laitiers. Rapport interne.

BRUANT J. P., 1974. Étude de quelques éléments d'intérêt écologique dans la chaîne eau-herbe-produits laitiers. Rapport interne.

BRUANT J. P., 1974. Étude de quelques éléments d'intérêt écologique lors de la fabrication d'un produit industriel : la bière. Rapport interne.

CHESCHEV K. S., BAREIKO I. B., 1971. Trace elements in wheat grain and the finished products. *Izv. Vissh. Uchebn. Zaved. Pisch. Tekhnol.*, **4**.

CZERNIEJEWSKI C. P., SHANK C. W., BECHTLEL W. G. and BRADLEY W. B., 1964. The minerals of wheat, flour and bread. *Cereal Chem.*, **41**, 65-72.

EL GINDY M. M., LAMB C. A. and BURREL R. C., 1957. Influence of variety, fertilizer, treatment and soil on the protein content and mineral composition of wheat, flour and flour fractions. *Cereal Chem.*, **34**, 185-195.

FOURCY A., BAQUEY M., NEUBURGER M., PLEBIN R., RIGOT J., 1972. Étude des rations alimentaires au moyen de l'analyse par radioactivation. Rapport C.E.A., n° R-4339.

HUISINGH D., 1974. Heavy metals, implications for agriculture. *Ann. Rev. Phytopath.*, **12**, 375-388.

LINNMAN L., ANDERSONN A., NILLSON K. O., 1974. Cadmium uptake by wheat from sewage sludge used as a plant nutrient source. *Arch. Environ. Health*, **27**, 45-47.

TKACHUK R., KUZINA F. D., 1972. Mercury levels in wheat and other cereals, oilseed and biological samples. *J. Sci. Food Agric.*, **23**, 1183-1195.

VARLEY J. A., 1966. Automatic methods for the determination of N, P and K in plant material. *Analyst*, **91**, 119-126.

Ann. Technol. agric., 1977, **26** (2), 199-213.

Composition de la fraction glucidique des eaux de fabrication de panneaux de fibre à partir de bois de feuillus

G. ALBAGNAC et J. N. MORFAUX
Avec la collaboration technique de Denise COQUET

Station de Technologie Alimentaire
Centre de Recherches de Lille, I.N.R.A.
369, rue Jules-Guesde, 59650 Villeneuve-d'Ascq

Résumé

Les glucides extraits du bois de feuillus lors de la fabrication de panneaux de fibre sont essentiellement des hémicelluloses partiellement hydrolysées (xylanes, glucomannanes, arabinogalactanes) et des oses (glucose et fructose). Pour étudier la fraction glucidique des eaux de fabrication, nous avons utilisé la détermination des oses par dosage enzymatique et par chromatographie liquide à grande vitesse, l'hydrolyse acide et enzymatique de la fraction polyosidique, la chromatographie sur gel. Nous avons pu ainsi mettre en évidence une composition tout à fait caractéristique des rejets polluants obtenus aux trois étapes principales de la fabrication en relation avec la résistance des diverses hémicelluloses à l'action de la vapeur d'eau sous pression.

Mots clés : Panneaux de fibre, eaux de fabrication, glucides, composition.

Introduction

Pour résoudre les problèmes posés par l'élimination de leurs rejets polluants, les usines françaises de panneaux de fibre ont décidé, après de nombreux essais, de mettre en place le recyclage intégral de leurs eaux de fabrication. Après bien des difficultés, le recyclage intégral des eaux a pu être installé à l'intérieur d'une usine traitant des bois de résineux (MARÉCHAL, 1973). Cependant, les problèmes posés n'ont pas encore été entièrement résolus dans le cas des usines utilisant du bois de feuillus. Comparativement à l'emploi de résineux, l'utilisation de bois de feuillus s'accompagne d'un risque plus élevé d'accidents de fabrication lorsque l'on réalise des panneaux avec une eau recyclée (CRAN, 1970). La principale difficulté à surmonter est due aux rendements de fabrication plus faibles obtenus avec les feuillus.

En effet, au cours d'une étude précédente (ALBAGNAC *et al.*, 1976), nous avons pu montrer que lors de l'avancement du recyclage, la nature et le degré de polymérisation des principaux constituants des eaux de fabrication atteignent très rapidement un équilibre. Cependant, nos essais ont également souligné que la concentration en matières solubles des eaux de fabrication doit être supérieure à 200 g/l pour compenser la mise en solution des constituants du bois. Cette concentration limite atteinte par les eaux en cas de recyclage intégral reste incompatible avec la réalisation industrielle des panneaux non tachés et présentant des caractéristiques satisfaisantes, donc facilement commercialisables. Dans un deuxième temps, il nous a paru intéressant d'étudier de façon plus détaillée la composition qualitative et quantitative des rejets polluants obtenus au cours des principales étapes de la fabrication. D'une part, il s'agit de mieux comprendre les phénomènes qui conditionnent la solubilisation des constituants du bois pour pouvoir expliquer et éventuellement modifier l'évolution du rendement de fabrication avec l'avancement du recyclage. D'autre part, une telle étude permettra, si le recyclage intégral des eaux s'avère impossible, de définir de façon sûre le traitement à appliquer à une partie des eaux avant leur réincorporation dans le circuit ou leur rejet dans le milieu récepteur. Cette première partie a été réalisée sur des échantillons d'eau prélevés sur un pilote industriel permettant la réalisation de panneaux expérimentaux. Nous nous sommes placés volontairement dans le cas extrême d'une usine travaillant en circuit ouvert, c'est-à-dire que l'eau rejetée n'a servi qu'à la réalisation d'un seul panneau. Nous avons tout d'abord étudié la nature de la fraction glucidique des eaux car elle représente 60 à 80 p. 100 des matières solubles extraites du bois lors de la fabrication.

Matériel et méthodes

1. — *Échantillons d'eaux*

Les échantillons d'eaux caractéristiques des principales étapes de la fabrication ont été obtenus avec un pilote industriel permettant la réalisation de panneaux mesurant 40 × 40 cm. Nous avons utilisé comme matière première de la pâte de feuillus prélevée en sortie d'un défibreur industriel.

a) La fabrication des panneaux dans des conditions très voisines de la réalisation industrielle comprend trois étapes :

— *Défibrage :*

Le défibrage mécanique du bois a été réalisé avec un appareil industriel de marque Defibrator. Les copeaux sont poussés à l'intérieur par une vis sans fin. Après un temps de contact de quelques minutes avec la vapeur sous pression (13 kg/cm^2), ils passent entre deux disques crantés contrarotatifs qui assurent la séparation des fibres. La pâte de bois obtenue sort de l'appareil à travers un diaphragme calibré. Une partie de la vapeur reflue par la vis d'alimentation en copeaux. Elle se condense et extrait des constituants du bois. Il s'écoule ainsi par la vis d'alimentation du défibreur un premier rejet polluant appelé « Eaux de vis ».

— *Dilution de la pâte et conformation du panneau:*

Le bois défibré est mis en suspension dans l'eau puis la conformation du panneau s'effectue sur la machine à former où l'eau de dilution est filtrée par aspiration sous vide. Le matelas de fibres obtenu subit alors une pressée à froid sous 2,5 kg/cm² pour l'amener à une siccité convenable pour le passage dans la presse à chaud. C'est au moment de la dilution de la pâte que les constituants du bois, partiellement hydrolysés par la vapeur sous pression, sont solubilisés dans les eaux de fabrication.

— *Pressée à chaud et sous forte pression:*

Cette dernière étape a pour but de donner au panneau sa cohésion et sa dureté. Une partie de l'eau restant dans le matelas de fibres après la pressée à froid est éliminée sous forme de vapeur. Le reste s'écoule et constitue le troisième rejet polluant.

L'ensemble de ces opérations est résumé figure 1 où sont également rapportés les bilans d'eau observés lors de nos essais.

b) Nous avons prélevé, en vue de leur analyse, les échantillons suivants :

L'échantillon E.V. correspond aux rejets s'écoulant par la vis d'alimentation du défibreur.

L'échantillon E.M.F. est constitué par le mélange des eaux de machine à former et de presse à froid.

L'échantillon E.P.C. correspond aux rejets de la presse à chaud.

2. — *Méthodes analytiques*

— Isolement, hydrolyse acide des fractions glucidiques des eaux et détermination des oses par chromatographie en phase gazeuse : selon les méthodes précédemment décrites (ALBAGNAC *et al.*, 1976).

— Hydrolyse enzymatique : cette hydrolyse est conduite pendant 18 heures à 40 °C et pH 4. L'enzyme est une préparation commerciale de GIST-BROCADES, la Maxazyme C-L. Il s'agit d'un mélange de cellulases et d'hémicellulases extraites d'un milieu de culture de *Trichoderma viride*.

— Dosage enzymatique des oses : le glucose, le fructose et le mannose sont dosés en UV par la méthode à l'hexokinase; le galactose est déterminé par la méthode à la galactose déshydrogénase. Le protocole détaillé et les réactifs nécessaires à ces déterminations sont disponibles chez BOEHRINGER (1973).

Remarquons que par la méthode à la galactose déshydrogénase, on dose simultanément le β-galactose et l'arabinose. Pour obtenir la concentration en β-galactose, il est nécessaire de tenir compte de la teneur en arabinose déterminée par chromatographie liquide à grande vitesse.

— Dosage des oses par chromatographie liquide à grande vitesse : cette détermination est réalisée avec un chromatographe WATERS équipé d'un réfractomètre différentiel R 401 et d'une colonne « ubondapak carbohydrate analysis ». L'éluant est le mélange acétonitrile-eau (85-15) pompé à 1,8 ml/min. La détermination quantitative des oses est effectuée en utilisant le glucose dosé par voie enzymatique comme étalon interne. Une série d'injections de mélanges témoins permet la détermination du temps de rétention et des coefficients de réponse. Cette technique a permis la détermination individuelle des pentoses.

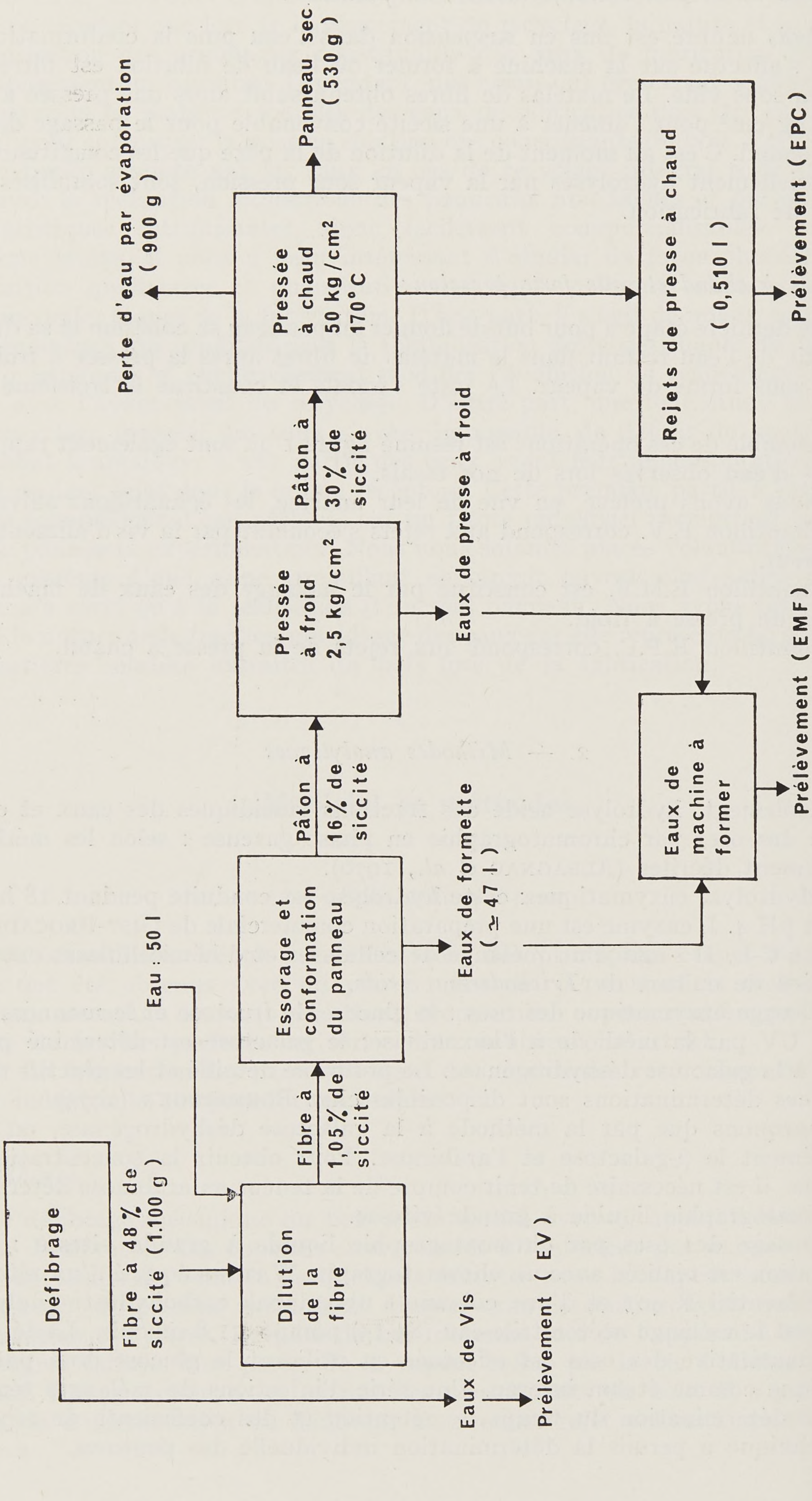


FIG. 1. — *Schéma de réalisation des panneaux de fibre en pilote industriel.*

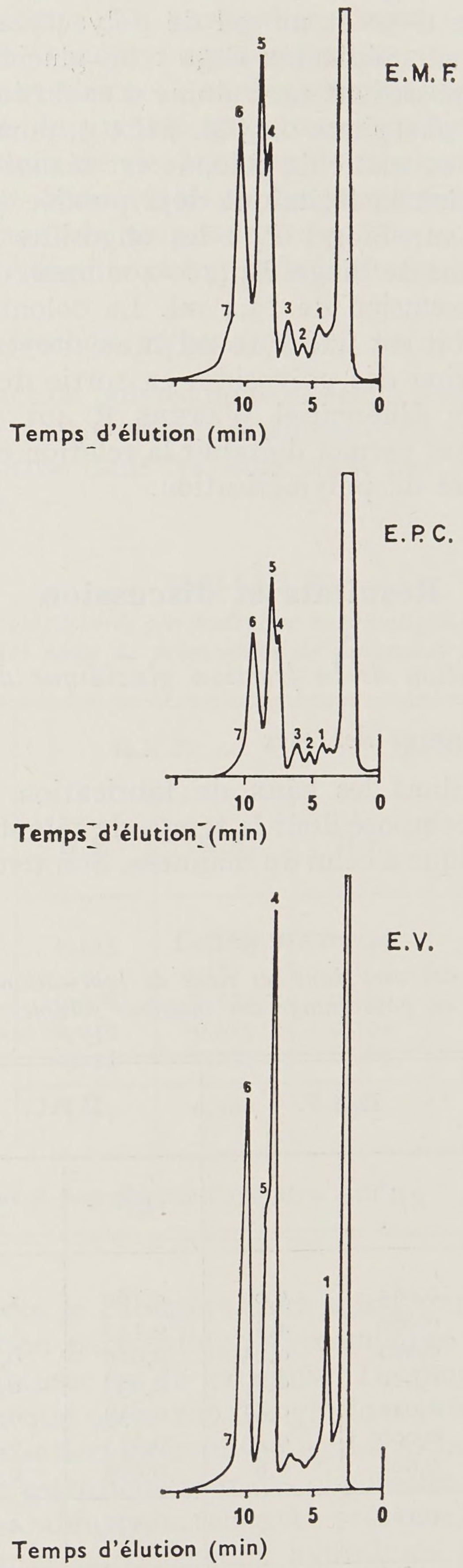


Fig. 2. — *Séparation par chromatographie liquide à grande vitesse des oses présents dans les eaux de fabrication de panneaux de fibre* (*injection* 20 µ*l*).

1. Rhamnose.
2. Xylose.
3. Arabinose.
4. Fructose.
5. Composé X non identifié,
6. Glucose.
7. Galactose.

— Chromatographie sur gel : nous avons utilisé deux types de gel : un gel de Dextrane, le Séphadex G-50 et un gel de polyacrylamide, le Biogel P_2.

— Chromatographie sur Séphadex G-50 : les glucides sont séparés sur une colonne de 1,6 × 88 cm possédant un volume d'exclusion de 65 ml. La colonne est éluée avec du tampon phosphate 0,05 M, pH 6,9, pompé à raison de 20 ml/h. La détection des glucides en sortie de colonne est réalisée en continu par dosage à l'anthrone sulfurique selon la technique déjà publiée (ALBAGNAC *et al.*, 1976).

— Chromatographie sur Biogel P_2 : les oligosides présents dans les eaux sont séparés sur une colonne de Biogel P_2 (200-400 mesh de 0,6 × 150 cm (42 ml)) possédant un volume d'exclusion de 13,4 ml. La colonne thermostatée à 55 °C est éluée par l'eau. Le débit est fixé à 10 ml/h au moyen d'une pompe à piston « Milton Roy ». La détection des polyosides en sortie de colonne est réalisée au moyen d'un réfractomètre différentiel WATERS R 401. Enfin, l'injection d'un mélange d'oligosides témoins permet d'établir la relation entre le volume d'élution d'un composé et son degré de polymérisation.

Résultats et discussion

1. — *Composition de la fraction glucidique des eaux*

1.1. — *Identification et dosage des oses*

Les oses rencontrés dans les eaux de fabrication sont essentiellement le glucose, le fructose et un composé dont le temps de rétention en chromatographie en phase gazeuse est identique à celui du mannose. Son temps d'élution en chromatographie en phase liquide est intermédiaire entre celui du fructose et celui du mannose (fig. 2). La nature de ce composé reste encore inconnue : en effet, le dosage enzymatique permet d'affirmer que le mannose n'existe qu'à l'état de trace dans les eaux étudiées (tabl. 1). Cependant, le temps de rétention du dérivé triméthylsilylé de X permet de penser qu'il s'agit d'un dérivé méthylé du glucose

TABLEAU I

Résultats du dosage des oses dans les eaux de fabrication exprimés en g/l et en pourcentage des matières solubles

	E.M.F.		E.P.C.		E.V.	
	g/l	%	g/l	%	g/l	%
Glucose	0,065	5,0	0,160	1,8	10,2	14
Fructose	0,060	4,5	0,145	1,6	10,5	14,6
Mannose	0,002	0,15	0,010	0,1	—	—
Galactose	0,010	0,8	0,033	0,3	0,36	0,5
Arabinose	0,011	0,8	0,033	0,3	0,37	0,5
Xylose	0,006	0,45	0,015	0,15	—	—
Rhamnose	0,008	0,6	0,025	0,25	—	—
Total	0,162	12,3	0,421	4,5	21,43	29,6

ou du galactose. Divers oses méthylés ont été mis en évidence aussi bien chez les feuillus que chez les résineux. En particulier, COCHRANE, GRAY et ARNI (1969) rapportent la présence de O-méthyl-2-galactose dans les hydrolysats des arabinogalactanes de châtaignier et d'orme. Dans les eaux de presse à chaud et de machine à former, nous trouvons, de plus, le galactose, l'arabinose, le xylose et le rhamnose. A l'exception des eaux de vis, les eaux de fabrication ne renferment qu'une très faible quantité d'oses libres (tabl. 1). La proportion d'oses dans les matières solubles sont respectivement de 30 p. 100, 12 p. 100, 4,5 p. 100 pour les eaux de vis, les eaux de machine à former et les eaux de presse à chaud.

1.2. — *Hydrolyse de la fraction polyosidique*

L'hydrolyse de la fraction polyosidique des eaux s'accompagne de la libération de galactose, d'arabinose, de glucose, de mannose et de xylose (tabl. 2). Par contre, la concentration du fructose dans les eaux n'est pas sensiblement modifiée par l'hydrolyse enzymatique.

TABLEAU 2

Résultats en g/l du dosage des oses libérés par hydrolyse enzymatique (H.E.) et hydrolyse acide (H.A.) dans les eaux de fabrication de panneaux de fibre

	E.M.F.		E.P.C.		E.V.	
	H.E.	H.A.	H.E.	H.A.	H.E.	H.A.
Glucose	0,145	0,165	0,740	0,820	2,80	4,80
Fructose	0	(*)	0	(*)	0	(*)
Mannose	0,006	0,022	0,100	0,400	—	—
Galactose + Arabinose	0,049	0,119	0,194	0,474	0,77	2,27
Xylose	0,054	0,054	0,885	0,895	—	—
Total	0,254	0,360	1,92	2,589	2,57	7,07

(*) Le fructose est totalement dégradé par l'hydrolyse acide.

Remarquons là encore le caractère tout à fait particulier des eaux de vis : l'hydrolyse de leur fraction polyosidique s'accompagne exclusivement de la libération de glucose, d'arabinose et de galactose. De plus, la chromatographie sur Biogel P_2 (fig. 4) montre que 95 p. 100 des glucides présents dans les eaux de vis ont un degré de polymérisation inférieur ou égal à 5. Les oligosides présents dans les eaux de vis sont donc essentiellement des oligomères de glucose et des produits d'hydrolyse partielle des arabinogalactanes. La présence dans les eaux de vis de X à côté d'arabinogalactanes partiellement hydrolysés est un argument supplémentaire permettant de considérer ce composé comme un dérivé méthylé du galactose (cf. § I.1).

Par ailleurs, le bilan d'eau au niveau de la presse à chaud (fig. 1) montre que les 2/3 de l'eau restant dans le panneau après la pressée à froid sont éliminés sous forme de vapeur. A priori, les concentrations des différents glucides dans les eaux de presse à chaud devraient être trois fois plus élevées que leurs homologues

dans les eaux de machine à former. Or, si le rapport Concentration dans les eaux de presse à chaud /Concentration dans les eaux de machine à former est voisin de trois pour les oses présents dans les échantillons non hydrolysés, il est nettement supérieur pour le glucose, le mannose et le xylose présents dans les hydrolysats. Nous assistons donc, au niveau de la presse à chaud, à une concentration de l'eau de machine à former restant dans le panneau après la pressée à froid ainsi qu'à une extraction supplémentaire de glucomannanes et de xylanes.

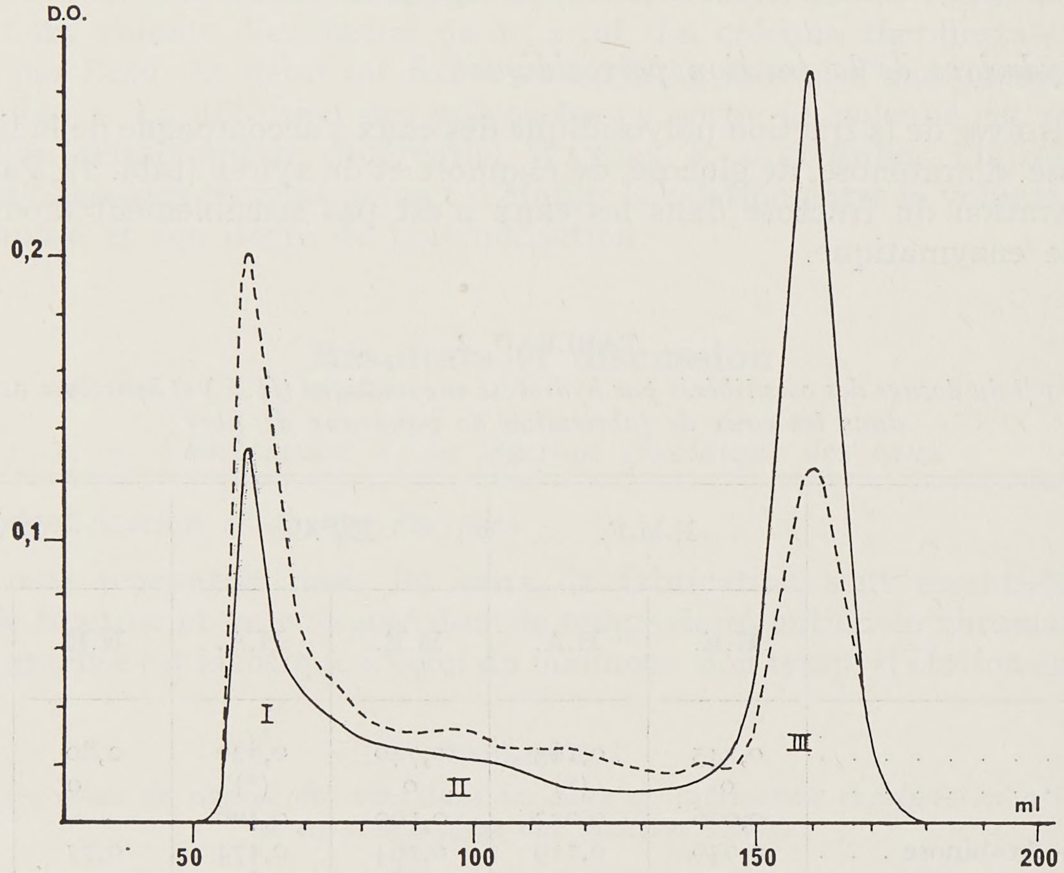


FIG. 3. — *Chromatographie sur Séphadex G.50 de la fraction glucidique des eaux de fabrication.*
——————— Eaux de machine à former (EMF).
— — — — — Rejets de presse à chaud (EPC).
En abscisse : volume d'élution (ml).
En ordonnée : densité optique obtenue par détection à l'anthrone.

1.3. — *Degré de polymérisation des glucides présents dans les eaux de fabrication*

1.3.a. — *Eaux de vis :* comme nous l'avons vu au paragraphe précédent, les glucides contenus dans les eaux de vis ont un degré de polymérisation très faible.

1.3.b. — *Eaux de machine à former et eaux de presse à chaud :* à concentration égale, le pouvoir réducteur et donc le nombre de groupements réducteurs terminaux des glucides contenus dans les eaux de presse à chaud sont inférieurs à ceux des glucides présents dans les eaux de machines à former. Cela permet de penser que le degré de polymérisation moyen des polyosides est plus élevé dans les eaux de presse à chaud que dans les eaux de machine à former. La chromatographie sur Séphadex G-50 permet de confirmer cette hypothèse.

Nous pouvons distinguer trois fractions dans les éluats de colonne (fig. 3). La fraction I renferme les glucides de poids moléculaire supérieur à 10 000 sortant en mélange au volume vide de la colonne. La fraction III contient les oligosides

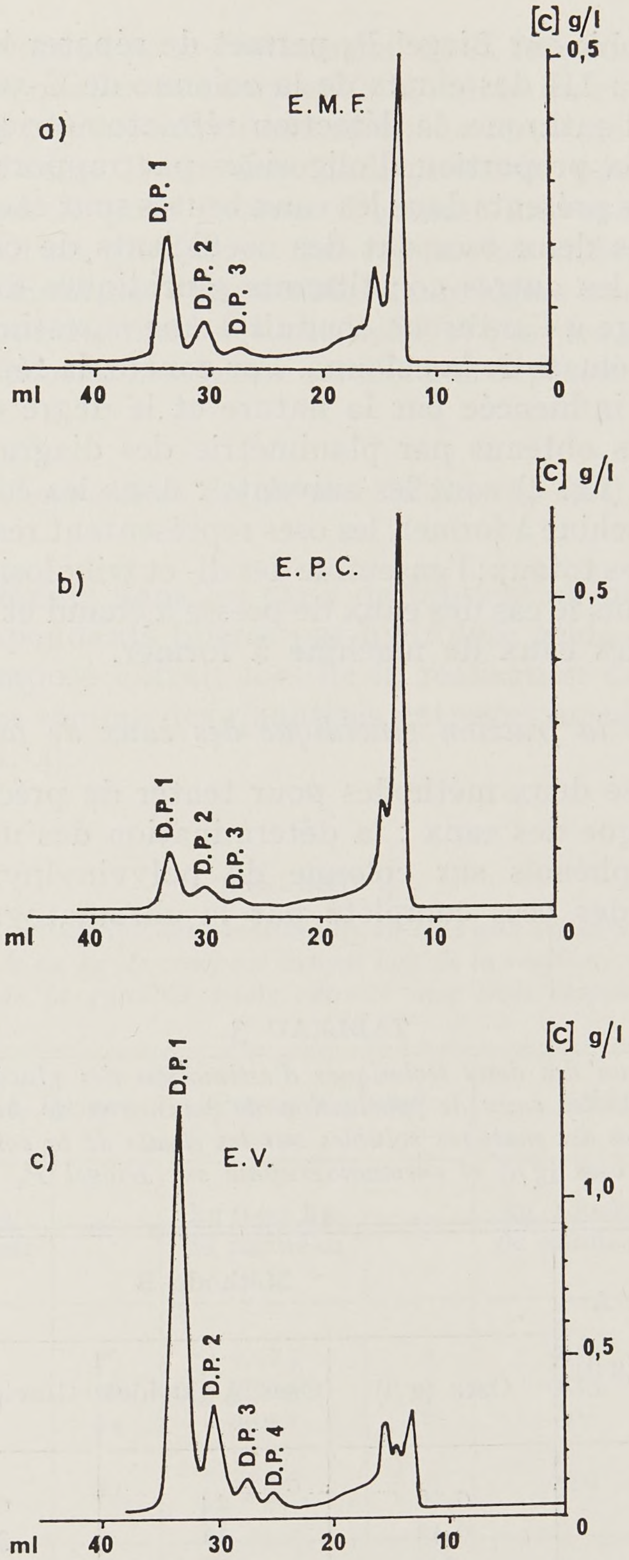


FIG. 4. — *Chromatographie sur Biogel P_2 des glucides présents dans les eaux de fabrication.*

En abscisse : volume d'élution (ml).

En ordonnée : concentration des glucides dans l'éluat exprimée en g/l de saccharose (détection réfractométrique).

D.P. = Degré de Polymérisation.

a) Eaux de machine à former.

b) Eaux de presse à chaud.

c) Eaux de vis.

de poids moléculaire inférieur à 500. Enfin, la fraction II est constituée par les glucides de poids moléculaire compris entre 500 et 10 000 élués de la colonne par ordre de poids moléculaire décroissant. Par rapport aux eaux de machine à former, les eaux de presse à chaud se distinguent par une proportion plus élevée de hauts polymères.

La chromatographie sur Biogel P_2 permet de séparer les différents oligosides constituant la fraction III des éluats de la colonne de G-50 (fig. 3). De plus, par rapport au dosage à l'anthrone, la détection réfractométrique permet d'apprécier de façon plus réelle la proportion d'oligosides par rapport aux glucides totaux. En effet, les oses libres présents dans les eaux brutes sont essentiellement le glucose et le fructose. Or, ces deux oses ont des coefficients de coloration à l'anthrone bien plus élevés que les autres constituants glucidiques des eaux. La détection des glucides par dosage à l'anthrone conduit à une surestimation de l'importance de la fraction III des éluats de la colonne. Par contre, la réponse du réfractomètre est nettement moins influencée par la nature et le degré de polymérisation des glucides. Les résultats obtenus par planimétrie des diagrammes d'élution sur la colonne de Biogel P_2 (fig. 4) sont les suivants : dans les eaux de presse à chaud et dans les eaux de machine à former, les oses représentent respectivement 11 p. 100 et 24 p. 100 des glucides totaux; l'ensemble des di- et triholosides représente 7 p. 100 des glucides totaux dans le cas des eaux de presse à chaud et 10 p. 100 des glucides totaux dans le cas des eaux de machine à former.

1.4. — *Estimation de la fraction glucidique des eaux de fabrication*

Nous avons utilisé deux méthodes pour tenter de préciser la valeur absolue de la fraction glucidique des eaux : la détermination des matières solubles après élimination des polyphénols sur colonne de polyvinylpyrrolidone (P.V.P.) et le dosage individuel des oses complété par la chromatographie sur Biogel P_2.

TABLEAU 3

Comparaison des deux techniques d'estimation des glucides totaux dans les eaux de fabrication de panneaux de fibre

Méthode A : *Détermination des matières solubles sur les éluats de la colonne de P.V.P.* (*g/l*)

Méthode B : *Dosage des oses* (*g/l*) *et chromatographie sur Biogel P_2*

	Méthode A	Méthode B			Résultats B / Résultats A %
	Glucides (g/l)	Oses (g/l)	Oses % glucides	Glucides (g/l)	
E.M.F.	1,1	0,16	24	0,66	60 %
E.P.C.	5,5	0,42	11	3,8	69 %
E.V.	36	24	80	30	83 %

En effet, cette technique permet d'obtenir la proportion d'oses dans la fraction glucidique des eaux. Les résultats obtenus à l'aide de ces deux techniques sont rassemblés dans le tableau 3. Nous observons une assez grande disparité entre les deux séries de valeurs. Remarquons tout de suite que dans l'évaluation des oses, nous n'avons pas tenu compte du composé X. Dans le cas des eaux de machine à former et des eaux de presse à chaud, il donne en chromatographie liquide un pic de même intensité que le fructose. Par contre, dans le cas des eaux de vis, le produit X existe en bien plus faible proportion. La nature exacte de ce composé étant encore inconnue, il est impossible de connaître son coefficient de réponse en réfractométrie et sa concentration dans les eaux. Cependant les deux techniques

donnent des résultats voisins pour l'estimation de la fraction glucidique des eaux de vis (tabl. 3) dans lesquelles le composé X n'existe qu'en faible quantité. Une première cause de la divergence des deux séries de résultats est due à la détermination incomplète des oses. Il est donc indispensable, par la suite, d'identifier et de doser le composé X pour essayer d'obtenir une meilleure estimation de l'importance de la fraction glucidique des rejets. Les différences entre les deux séries de résultats sont également imputables à une légère contamination des éluats de colonne de P.V.P. par des matières minérales et par des composés phénoliques peu polymérisés; cette contamination ne semble pas dépasser 10 p. 100 (ALBAGNAC *et al.*, 1976).

1.5. — *Importance de l'extraction des hémicelluloses du bois aux différentes étapes de la fabrication*

Les polyosides présents dans les eaux de fabrication ont été estimés par les quantités d'oses correspondants libérés par hydrolyse acide. Les résultats ont été exprimés en kg de composé extrait lors de la réalisation de 100 kg de panneau et en pourcentage de la somme des quantités extraites au niveau des trois étapes de la fabrication (tabl. 4).

TABLEAU 4

Importance relative de la solubilisation des constituants du bois aux différentes étapes de la fabrication. Les résultats sont exprimés en kg de composé extrait lors de la réalisation de 100 kg de panneau et en pourcentage de la quantité totale extraite aux trois étapes de la fabrication

	Machine à former		Presse à chaud		Défibrage		Total kg/100 kg de panneau
	kg/100 kg de panneau	%	kg/100 kg de panneau	%	kg/100 kg de panneau	%	
Glucose. . . .	0,570	79	0,015	2	0,14	19	0,725
Fructose . . .	0,520	76	0,013	2	0,15	22	0,683
Mannose . . .	0,017	94	0,001	6	0	0	0,018
Arabinose + Galactose. .	0,170	92	0,006	3	0,01	5	0,186
Glucanes . . .	1,40	90	0,077	5	0,07	5	1,470
Mannanes. . .	0,18	83	0,038	17	—	—	0,218
Arabinose-galactanes . .	0,99	93	0,045	4	0,03	2,5	1,065
Xylanes. . . .	0,475	85	0,086	15	—	—	0,561

Quel que soit le glucide considéré, il est extrait essentiellement au niveau de la machine à former (tabl. 4). Cela résulte des caractéristiques de fabrication qui conduisent à un volume des eaux de machine à former 100 fois plus élevé que celui des eaux de presse à chaud et 700 fois plus élevé que celui des eaux de vis. Remarquons cependant que les eaux de vis renferment une proportion non négligeable du fructose et du glucose extraits lors de la réalisation des panneaux (environ 15 %).

De même, une proportion non négligeable de l'ensemble des xylanes et des glucomannanes est extraite au niveau de la presse à chaud.

1.6. — *Comparaison des résultats obtenus par hydrolyse enzymatique et par hydrolyse acide*

Les préparations enzymatiques isolées des milieux de culture de *Trichoderma viride* renferment essentiellement des cellulases (SELBY et MAITLAND, 1967) et des xylanases (HASHIMOTO, MURAMATSU et TUNATSU, 1971; HASHIMOTO et FUNATSU, 1976).

Cela explique que les quantités de glucose et de xylose libérées par hydrolyse acide et enzymatique soient sensiblement égales. Par contre, l'hydrolyse enzymatique ne conduit qu'à une hydrolyse partielle des arabinogalactanes et des glucomannanes présents dans les eaux (tabl. 2).

Enfin, nous avons vu (§ 1.2) que l'hydrolyse enzymatique ne libérait pas de composé X que nous avons supposé associé aux arabinogalactanes. Cette constatation ne vient pas à l'encontre de l'hypothèse émise puisque l'hydrolyse enzymatique des arabinogalactanes n'est que partielle.

Discussion

Les constituants des eaux de vis sont extraits à contre-courant des copeaux par la vapeur qui fuit à travers la vis d'alimentation du défibreur puis se condense. Dans ces conditions, le temps de contact du bois et de la vapeur est très court au niveau de la vis d'alimentation alors qu'il est de l'ordre de plusieurs minutes à l'intérieur du défibreur. La caractérisation des composés présents dans les eaux de vis renseignent sur la nature des constituants les plus facilement extractibles du bois après l'action de la vapeur d'eau sous pression. Le dosage des oses dans les eaux de vis avant et après hydrolyse ainsi que la chromatographie sur Biogel P_2 de la fraction glucidique de ces eaux montrent qu'il s'agit du glucose, du fructose, d'oligomères de glucose et d'oligosides résultant de l'hydrolyse partielle d'arabinogalactanes et du composé X qui pourrait être un dérivé méthylé du galactose (cf. § I.1 et I.2).

Après défibrage, au moment de la mise en suspension de la pâte dans l'eau de fabrication, les composés résultant de l'hydrolyse partielle des constituants du bois sont extraits et viennent constituer les matières solubles présentes dans les eaux de machine à former. L'analyse de ces eaux va donc nous renseigner sur la nature des constituants du bois partiellement dégradés par la vapeur sous pression. Le défibrage affecte essentiellement les hémicelluloses (xylanes, glucomannanes et arabinogalactanes). La libération de glucose, en quantité non négligeable, par la préparation enzymatique pourrait laisser penser que le défibrage mécanique conduit également à une dégradation partielle de la cellulose. Cependant, des glucanases autres que les cellulases ont été mises en évidence dans les préparations enzymatiques obtenues à partir des champignons filamenteux (BAHL et AGRAWAL, 1969). En l'absence de renseignements supplémentaires sur les diverses activités enzymatiques présentes dans la préparation utilisée, il nous est impossible de conclure sur la nature exacte de la fraction glucane des eaux. Selon BJORKLUND et BACK, 1974, le défibrage mécanique sous pression de vapeur n'entraîne pas une dégradation de la cellulose. Actuellement, nous ne pouvons confirmer ni infirmer ce résultat.

Enfin, l'étude des différences observées entre la composition des eaux de machine à former et celle des eaux de presse à chaud permet de préciser quelques-unes des modifications subies par les constituants du bois lors de la pressée à chaud. On assiste, au niveau de la presse à chaud, à une concentration de l'eau de fabrication restant dans le panneau après pressée à froid. Mais il se produit également une extraction supplémentaire de xylanes et de glucomannanes. Cela montre que dans un premier temps, lorsqu'il reste de l'eau dans le panneau, la pressée à chaud et sous pression s'accompagne de phénomènes hydrolytiques qui conduisent à l'extraction et à la dégradation partielles d'hémicelluloses non attaquées par le défibrage. De plus, les glucides de haut poids moléculaire sont proportionnellement plus abondants dans les eaux de presse à chaud que dans les eaux de machine à former. La comparaison de ces deux résultats nous renseigne sur la nature des polyosides de poids moléculaire élevé présents dans les eaux de fabrication. Il s'agit de xylanes et de glucomannanes partiellement hydrolysés.

Conclusion

Cette étude de la composition qualitative et quantitative des rejets polluants permet de mieux connaître les constituants glucidiques du bois solubilisés lors de la fabrication des panneaux de fibre : ce sont essentiellement des hémicelluloses partiellement hydrolysées. Cependant, l'on trouve également dans les eaux de fabrication une quantité non négligeable de glucose, de fructose et d'oligomères de glucose, ces derniers ne paraissant pas provenir d'une hydrolyse partielle de la cellulose. La résistance différente des hémicelluloses à l'hydrolyse par la vapeur d'eau conduit à une composition tout à fait caractéristique de chacun des rejets polluants émis aux principales étapes de la fabrication. Les arabinogalactanes qui sont les hémicelluloses les plus facilement extraites se rencontrent essentiellement dans les eaux de machines à former. Par contre, les xylanes et les glucomannanes qui sont plus difficilement hydrolysables sont extraits préférentiellement au niveau de la presse à chaud. Les résultats obtenus permettent, de plus, de préciser l'importance relative des différentes étapes de la fabrication dans la solubilisation des constituants du bois. Bien que la majorité des glucides extraits se retrouvent dans les eaux de machine à former, les eaux de vis et les eaux de presse à chaud renferment respectivement une fraction non négligeable des oses et des xylanes extraits du bois. Les faibles rendements (quantité de panneau sec produit par rapport à la quantité de bois sec mis en fabrication) obtenus avec les feuillus qui sont, selon nous, à la base des problèmes posés par le recyclage intégral des eaux, sont dus à une extraction des hémicelluloses du bois. Or, c'est au défibrage que se produisent les phénomènes hydrolytiques qui conditionnent la mise en solution des constituants du bois au niveau de la machine à former. On peut penser améliorer sensiblement le rendement de fabrication par une modification des conditions de défibrage. On est cependant assez rapidement limité dans cette voie. En effet, un temps de contact du bois avec la vapeur trop court se traduit par une plus grande dépense d'énergie pour entraîner les disques du défibreur et par l'obtention d'une pâte de texture grossière ne convenant pas pour la fabrication de panneaux sans défauts de surface. L'hypothèse d'un recyclage seulement partiel des eaux de fabrication étant donc sérieusement envisageable, se pose alors le problème du choix de traitement à appliquer à la partie des eaux non recyclées. L'épuration biologique semble exclue *a priori* étant donné la très forte concentration des effluents. La valorisation par culture de microorganismes s'avère difficile étant

donné la composition tout à fait particulière de ces rejets qui renferment jusqu'à 40 p. 100 des composés phénoliques et sont dépourvus d'azote. Une voie plus rationnelle semble fournie par une floculation chimique des polyphénols et des polyosides et la réincorporation du surnageant dans le circuit d'eau de fabrication. Enfin, le passage dans des évaporateurs à faible enthalpie permettant la concentration, sans dépense excessive d'énergie, d'eaux à température moyenne jointe à la combustion des concentrats peut constituer une solution valable au problème posé par le traitement d'une partie des eaux recyclées. En effet, la température de ces eaux est comprise entre 60 et 80 ^{0}C et elle est d'autant plus élevée que le recyclage est plus poussé.

Sur le plan méthodologique, la détermination des oses par dosage enzymatique ou par chromatographie liquide fournit des résultats plus sûrs et plus reproductibles que le dosage des dérivés triméthylsilylés par chromatographie en phase gazeuse. D'autre part, bien que l'hydrolyse enzymatique par la préparation brute d'hémicellulases de *Trichoderma viride* n'ait donné que des résultats partiels, cette technique paraît pouvoir posséder des développements intéressants pour l'étude des mélanges de glucides extraits du bois. Après purification et caractérisation des différentes activités de l'extrait, il devient, en effet, possible de procéder à des dégradations sélectives.

Reçu pour publication en mai 1977.

Summary

Composition of the carbohydrate fraction of waste waters from fibre panels manufacture with leafy woods

The carbohydrates extracted from hardwoods during fibreboard processing are chiefly partially hydrolysed hemicelluloses (xylans, glucomannans, arabinogalactans) and sugars (glucose and fructose). In the course of this study we have used enzymatic methods and high speed liquid chromatography for the determination of sugars. The polysaccharidic fraction was studied by means of acidic and enzymatic hydrolyzes and gel chromatography. We found that the waste waters from the three main processing steps have a characteristic composition related to the resistance of the various hemicelluloses against the action of pressurised steam.

Key-Words: Fibre panels, water from manufacture, glucies, composition.

Références bibliographiques

ALBAGNAC G., GIBERT P., SARRIS J., MORFAUX J. N., 1976. Évolution de la fraction polysaccharidique des eaux de fabrication de panneaux de fibre sous l'action du recyclage. *Revue A.T.I.P.*, **30** (5), 190-195.

BACK E., BJORKLUND M., BACK C., 1974. Coagulability and composition of dissolved material from pressurised refining. C.R. FEROPA Waste Water Working Group, Francfort/Main, juin 1974.

BAHL O. P., AGRAWAL K. L. M., 1969. Glycosidases of *Aspergillus niger*. I. Purification and characterisation of α and β-galactosidases and β-N-acetyl glucosaminidase. *J. Biol. Chem.*, **244** (11), 2970-2978.

BOEHRINGER, 1973. Enzymatic analyses for food chemistry, 28-35.

COCHRANE G. C., GRAY J. O., ARNI P. C., 1969. The emission of corrosive vapours by wood. Hot-water-extracted O-acetylated hemicelluloses from sweet chesnut (*Castanca sativa*) and whych elm (*Ulmus glabra*) and a discussion of O-acetyl-group changes occuring in these woods during incubation at 48^0 and 100 % relative humidity. *Biochem. J.*, **113**, 253-257.

CRAN G., 1970. Waste water from fibreboard mills. C.R. Int. Congr. Industrial water, Stockholm, 299-321.

HASHIMOTO S., MURAMATSU T., FUNATSU M., 1971. Studies on xylanases from *Trichoderma viride* Part I. Isolation and some properties of crystalline xylanase. *Agr. Biol. Chem.*, **35** (4), 501-508.

HASHIMOTO S., FUNATSU M., 1976. Fractionation of subunits in xylanases from *Trichoderma viride* with a new simple preparative polyacrylamide gel electrophoresis apparatus. *Agr. Biol. Chem.*, **40** (3), 635-636.

MARÉCHAL B., 1973. Produire proprement : l'exemple d'ISOREL à Casteljaloux. *Revue Agence de Bassin Adour-Garonne*, **3**, 18-22.

SELBY K., MAITLAND C. C., 1967. The cellulase of *Trichoderma viride*, Separation of the components involved in the solubilization of cotton. *Biochem. J.*, **104**, 716-724.

Ann. Technol. agric., 1977, **26** (2), 215-223.

Note

Prévention et lutte contre les pollutions et nuisances des industries de la canne à sucre (***)

J. C. NOEL (*) et J. P. VELLAUD (**)

(*) *Agence Financière Artois-Picardie*
(**) *Ministère de la Culture et de l'Environnement*
14, *boulevard Général-Leclerc*, 92521 *Neuilly*

L'industrie de la canne à sucre était représentée en 1971 dans les départements de la Guadeloupe et de la Martinique par une cinquantaine d'établissements dont 13 sucreries ou sucreries-distilleries et 37 distilleries travaillant pour la plupart du jus de canne. Si la capacité des distilleries varie entre 1,5 à 400 hl d'alcool pur par jour, celle des sucreries, exprimée en capacité journalière d'écrasement des cannes se situe dans la fourchette de 1 500 à 3 000 t par jour.

En 1974, 1 560 000 t de cannes ont ainsi été travaillées pour donner 111 000 t de sucre et 223 000 hl d'alcool pur dont 112 000 hl de rhum agricole. Le niveau de production de ces usines varie sensiblement d'une année à l'autre en fonction notamment des conditions météorologiques.

La prise en compte des problèmes liés à la protection de l'environnement aussi bien par le public que par les responsables politiques a conduit, depuis deux ans, le Ministère de la Culture et de l'Environnement à étudier le secteur de l'industrie de la canne à sucre. Cet examen doit permettre de connaître : l'importance des pollutions et des nuisances induites par cette branche d'activité, les solutions techniques à mettre en œuvre pour les réduire voire les éviter, et les dépenses qui en résulteront pour ces usines.

Avant de présenter et de commenter les résultats obtenus, il convient de décrire les procédés de fabrication employés dans les usines des Antilles françaises pour situer notamment les points d'apparition des pollutions et des nuisances.

Bien que le sujet concerne essentiellement les distilleries de cannes à sucre, les problèmes posés par les sucreries auxquelles sont annexées certaines distilleries seront abordés rapidement.

Mots clés : Canne à sucre, industries, pollution, prévention.

(***) Exposé présenté lors du Symposium International sur les Rhum, les Alcools et Boissons Alcooliques dérivés de la canne à sucre, 4-11 mai 1975, Antilles Françaises.

I. — Techniques de fabrication utilisées et conséquences pour la pollution des eaux et de l'atmosphère

A) *Procédés de fabrication*

La figure 1 représente le schéma simplifié de la transformation de la canne à sucre.

1. *Sucreries*

On peut considérer en moyenne et en année normale que le traitement d'une tonne de cannes fournit environ 80 kg de sucre et 25 l de mélasse (soit 40 kg à 31 %-35 % de sucre).

La canne est écrasée dans des moulins (4 ou 5 en série) pour exprimer le jus de constitution. Il y a en général imbibition de la canne par de l'eau propre qui est introduite au dernier moulin et remonte à contre-courant jusqu'au deuxième ou troisième moulin. La quantité introduite varie de 150 à 350 l/t de canne traitée.

Le résidu cellulosique (bagasse) restant après expression du jus représente environ 275 à 300 kg/t de cannes; il contient 45 à 50 p. 100 d'eau. Cette bagasse est utilisée comme combustible et les usines sont ainsi totalement autonomes en énergie. Elles sont même souvent excédentaires en bagasses qui peut être brûlée sur champs.

Le jus est ensuite épuré par un mélange de chaux et de magnésie représentant environ 1 kg par tonne de cannes. Il n'y a pas de carbonatation. Après chauffage à 105 °C environ il y a une décantation. Les boues soutirées à la base du décanteur (90 kg environ par tonne de cannes) sont filtrées sous vide (filtre rotatif en général) et stockées sur place. Elles constituent les écumes (45 % de matières sèches) qui représentent 3,5 à 4 kg/t de cannes.

La concentration du jus se fait classiquement dans une batterie d'évaporation sous vide à 5 effets et les eaux condensées (750 l environ par tonne de cannes) sont mélangées avec les eaux de refroidissement du condenseur. Ces eaux contiennent un peu de sucre et très peu d'ammoniaque. Elles sont de bien meilleure qualité que les eaux du condenseur du jus de betteraves.

Le tableau 1 regroupe les chiffres caractéristiques moyens correspondant à la fabrication du sucre de canne.

TABLEAU I

Traitement en sucrerie d'une tonne de cannes à sucre

Nécessite :	*Produit :*
— 150 à 350 l d'eau claire	— 80 kg de sucre — 275 à 300 kg de bagasse — 3,5 à 4 kg d'écumes à 55 % d'humidité — 750 l d'eau condensée — 25 l (40 kg de mélasse)

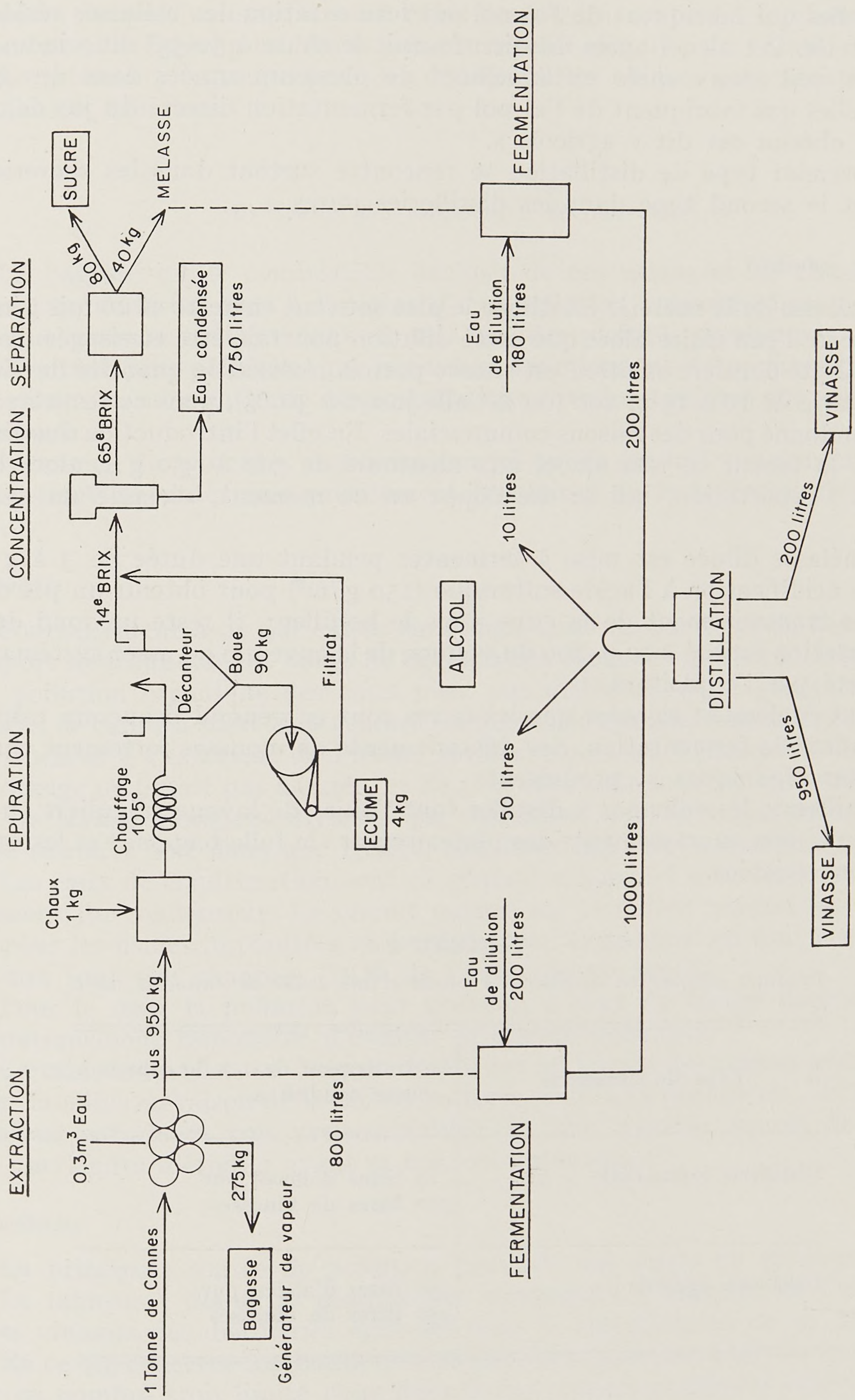


FIG. 1. — *Schéma simplifié de la transformation de la canne à sucre.*

2. *Distilleries*

Deux sortes de distilleries existent aux Antilles françaises :

— celles qui fabriquent de l'alcool par fermentation des mélasses résiduaires de la sucrerie. Cet alcool après dilution fournit le rhum à 50-55° dit « industriel » soit blanc, soit vieux après vieillissement de plusieurs années dans des fûts.

— celles qui fabriquent de l'alcool par fermentation directe du jus de canne. Le rhum obtenu est dit « agricole ».

Le premier type de distillation se rencontre surtout dans les sucreries-distilleries et le second type dans les distilleries pures.

Rhum industriel

La mélasse de la sucrerie est diluée le plus souvent entre 10 et 20 fois généralement avec de l'eau claire alors que cette dilution pourrait être envisagée avec des vinasses. Cette dernière solution est encore parfois réalisée, la quantité de vinasses utilisées varie de 10 à 15 p. 100 (on est allé jusqu'à 30 %), mais ce recyclage tend à être abandonné pour des raisons commerciales. En effet l'introduction des vinasses augmente la teneur en non alcool aux alentours de 300 à 350 g/l, alors que le marché à l'exportation, qui se développe en ce moment, réclame un alcool à 250 g/l.

La mélasse diluée est mise à fermenter pendant une durée de 3 à 4 jours après une acidification à l'acide sulfurique (150 g/m^3) pour obtenir un pH de 4,5.

Après transvasement de la cuve dans le bouilleur, il reste un fond de cuve de fermentation estimé à 10 p. 100 du volume de la cuve qui est assez systématiquement rejeté par l'exploitant.

Il faut également signaler que les cuves sont en général beaucoup trop remplies; pendant la fermentation, des débordements de mousses fortement chargées en matières organiques se produisent.

Par ailleurs, les colonnes à distiller font l'objet de lavages réguliers ou occasionnels suite aux encrassements des plateaux par « la folle bagasse » et les eaux de lavage sont rejetées.

TABLEAU 2

Produits obtenus en distillerie à partir d'une tonne de canne à sucre

Type de distellerie	Le traitement de 1 t de cannes à sucre conduit à
Distillerie industrielle.	10 litres d'alcool pur 200 litres de vinasses
Distillerie agricole	50 litres d'alcool pur 950 litres de vinasses

Enfin et surtout, la distillation donne naissance à des résidus appelés *vinasses*. Elles représentent en volume environ 96 p. 100 du volume de vin mis en fermentation soit 20 litres de vinasses par litre d'alcool pur produit. On peut considérer qu'en moyenne 1 t de mélasse donne 300 l d'alcool pur.

Rhum agricole

Le rhum agricole est obtenu par fermentation du jus de canne lequel est obtenu comme en sucrerie sans qu'il y ait évidemment d'épuration à la chaux. Ensuite la fermentation à quelques détails près est réalisée comme pour l'alcool de mélasse.

Le tableau 2 regroupe pour les distilleries les chiffres caractéristiques pour la pollution des eaux.

B) *Sources des pollutions et des nuisances*

La bagasse est le combustible exclusif de ces usines et les chaudières qui utilisent ce matériau sont à l'origine d'une pollution atmosphérique notable qui provoque, comme souvent dans de tels cas, des plaintes nombreuses. Ces rejets sont d'autant plus polluants que ces usines fonctionnent de manière très discontinue et que la mise en route des installations entraîne toujours une pollution plus importante.

L'examen des procédés de fabrication tel qu'il a été fait au paragraphe précédent permet de situer très précisément les points où la pollution des eaux est créée.

1. *Sucreries*

Contrairement à ce qui existe en France dans les sucreries de betteraves, le transport hydraulique des boues de décantation (écumes) qui est à l'origine d'une forte pollution organique des eaux n'est pas utilisé en règle générale dans les sucreries de canne à sucre. Les écumes sont évacuées par des bandes transporteuses puis stockées à l'extérieur de l'usine. Malheureusement, l'étanchéité de ces aires de stockage ne paraît pas assurée, et de plus elles sont souvent traversées par des eaux de lavage d'origines diverses qui entraînent une forte pollution organique qui se retrouve soit dans une rivière, soit dans une nappe souterraine.

Les eaux de condensation sont en général mélangées avec les eaux de refroidissement du condenseur. Le circuit ouvert sur le milieu naturel est assez rare sauf pour les usines implantées en bord de mer. Cependant en tout état de cause ces eaux sont peu chargées (DCO de l'ordre de 50 mg/l).

Pour le reste la pollution peut provenir d'eaux de lavage diverses dont il est pratiquement impossible d'évaluer la charge polluante.

Certains industriels envisagent de réaliser un lavage des cannes avant passage sur les moulins en raison de la teneur en terre de plus en plus élevée. Cette nouvelle technique entraînera très vraisemblablement une nouvelle source de pollution qu'il conviendra d'étudier avant sa mise en application.

2. *Distilleries*

La principale source de pollution provient des rejets de vinasses.

Le tableau 3 donne le résultat des campagnes d'analyses de l'année 1974 sur les vinasses des distilleries agricoles dans le Département de la Martinique.

En ce qui concerne les distilleries industrielles, quelques analyses ont été faites mais en nombre trop limité pour donner des valeurs moyennes exploitables. La DCO de ces effluents peut atteindre 140 000 mg/l et la DBO_5 30 000 mg/l. En tout état de cause ces effluents sont encore plus chargés en matières polluantes que les vinasses des distilleries agricoles.

Il convient de signaler que les valeurs données ci-dessus pour les distilleries

TABLEAU 3

Caractéristiques des vinasses de distilleries agricoles

	pH	DBO_5 (mg/l)	DCO (mg/l)	MeS (mg/l)	Volume des vinasses en m³ par hl d'alcool pur (A.P.)	DBO_5 en kg par hl (A.P.)	DCO en kg par hl (A.P.)	MeS en kg par hl (A.P.)
Valeur moyenne	2,80	5 480	16 350	2 460	1,60	8,70	26	3,9
Extrêmes	2,20 3,30	4 600 6 750	8 930 24 110	1 120 4 020	0,90 2,00	5,1 14	8 48	1,1 8,0

ne prennent pas en compte la pollution apportée par les fonds de cuve et le nettoyage des colonnes à distiller.

Cette pollution représente environ par hectolitre d'alcool pur produit :

23 kg de DCO, 12 kg de DBO_5, 2 kg de MeS.

Cette pollution est facilement récupérable.

En prenant comme paramètre de pollution la DCO (70 g /j), et en le rapportant à la pollution produite par jour par habitant, on constate que la production d'un hl d'alcool pur donne naissance à une pollution équivalente à celle que produisent :

700 habitants en une journée pour la distillerie agricole.

1 400 habitants en une journée pour la distillerie industrielle.

En négligeant la pollution des eaux des sucreries de canne à sucre, on peut dire que la pollution organique induite par les distilleries de cannes à sucre est équivalente à celle que produisent 1 500 000 habitants en une journée soit presque le double de la population des deux départements.

Cette comparaison situe le niveau de pollution potentielle de ces industries aux Antilles. Pour limiter les conséquences de cette pollution sur le milieu naturel des solutions techniques existent.

Avant de terminer ce tour d'horizon il faut évoquer les mauvaises odeurs qui se dégagent de certains bassins dans lesquels les effluents fermentent.

II. — Réduction de la pollution atmosphérique et de la pollution contenue dans les eaux usées

A) *Pollution atmosphérique*

Les rejets dans l'atmosphère des installations de combustion des usines devraient passer sur des filtres appropriés pour retenir les poussières.

B) *Pollution des eaux*

Comme dans la plupart des usines, la réduction de la pollution des eaux doit comprendre d'une part, des mesures internes à l'établissement qui visent à réduire, voir éviter, les rejets de matières polluantes dans les eaux et, d'autre part, la mise en œuvre sur les eaux usées de techniques d'épuration pour que les rejets se fassent avec le moins de perturbation possible du milieu récepteur.

Mesures internes

Sucrerie

a) La réalisation dans chaque usine d'une évacuation à sec des écumes suivie d'un stockage sur une aire étanche évite toute pollution des eaux de nappe et de surface par ces résidus.

b) La mise en place d'un condenseur par contact ou par mélange et d'un circuit fermé sur un réfrigérant atmosphérique, pour les eaux de refroidissement, évite pratiquement tout rejet de matières polluantes à ce niveau.

Ces aménagements et une bonne gestion de l'établissement feront qu'une sucrerie de cannes à sucre, sans investissement considérable dans la majorité des cas, ne sera plus une source de pollution.

Distilleries

c) La récupération systématique des levures dans les fonds de cuve de fermentation (3 à 6 kg de levure sèche par hl d'alcool) permet de diminuer de 40 p. 100 la pollution des distilleries agricoles et de 20 p. 100 celle des distilleries industrielles. Ces levures peuvent être valorisées par des utilisations agricoles.

d) La récupération systématique des levures dans les vinasses par centrifugation par exemple permettrait de diminuer de 50 p. 100 environ la charge polluante de ces effluents.

Ces deux opérations concernent aussi bien les distilleries agricoles que les distilleries industrielles.

e) Les vinasses de mélasse avec leurs levures additionnées des fonds de cuve pourraient être concentrées par évaporation et destinées à des utilisations agricoles. Cette technique ne peut s'envisager évidemment que pour des installations importantes (100 hl/j d'alcool pur ou plus). Le coût de fonctionnement restera limité si l'énergie est fournie par les excédents de bagasse disponibles.

La mise en place de ces techniques de récupération ou de valorisation et une bonne gestion de l'usine pour éviter par exemple les débordements des cuves de fermentation sont de nature à réduire considérablement la pollution produite par ces usines.

Traitement des effluents

Plusieurs techniques peuvent être envisagées pour traiter les eaux usées des distilleries de cannes à sucre.

f) Stockage des vinasses et déstockage contrôlé.

Cette opération a déjà été réalisée avec un certain succès. Elle pourrait être généralisée dans les Antilles pour les distilleries agricoles en raison des crues brutales que subissent les cours d'eau en période pluvieuse.

Cette technique consiste donc à stocker la totalité des vinasses produites pendant la campagne de distillation, des fonds de cuves et des eaux de nettoyage dans des bassins étanches et à déstocker ces effluents à l'époque des fortes eaux des milieux récepteurs. La quantité de charge polluante déversée dans le milieu sera encore importante — il se peut cependant qu'une auto-épuration se produise dans les bassins, des études sont réalisées actuellement sur ce sujet — mais du fait de la dilution, cette charge polluante sera à l'origine de moins de perturbation que si ces effluents avaient rejoint la rivière pendant la campagne (période de basse eau des rivières).

Cependant des odeurs désagréables se dégageront des bassins de stockage lors des fermentations et ces bassins devront être le plus éloignés possible des zones habitées.

Par ailleurs, cette solution ne convient pas pour les rejets directs en mer.

g) Épandage.

Cette technique présente de l'intérêt dans la mesure où elle peut être utilisée à l'époque où les besoins en eau des cannes ne sont pas satisfaits. Il sera donc nécessaire également de stocker les eaux usées pour en disposer à la bonne période. Cette solution nécessite au préalable une étude agronomique pour fixer les doses à apporter en fonction des besoins des cultures en éléments fertilisants. Il semble qu'un apport de 50 mm par an de vinasses délevurées sur un champ de cannes en rotation triennale constitue une dose acceptable.

Il convient cependant de rappeler que cette technique est à utiliser de préférence sur des terrains à pente peu prononcée.

h) Traitement dans une station d'épuration.

Ce procédé n'a pas fait, à notre connaissance, l'objet d'études approfondies aux Antilles. Cependant certaines remarques peuvent être faites dès à présent.

La station devra être conçue et exploitée pour traiter de manière satisfaisante l'effluent très chargé d'une usine qui ne fonctionne que quelques mois dans l'année. Cela implique de disposer soit d'une installation largement dimensionnée, donc onéreuse, pour traiter pendant une courte période un gros flux de pollution, soit de bassins de stockage pour étaler, sur une période aussi longue que possible, le traitement dans une station de plus petite dimension. Dans cette dernière hypothèse, la station fonctionnera en dehors de la campagne ce qui peut poser certains problèmes d'exploitation.

Compte tenu de la très forte charge de pollution contenue dans les effluents à traiter, les stations d'épuration à boue activée produiront des boues brutes dont le volume risque d'être de l'ordre de grandeur de celui de l'effluent à traiter. Se posera donc le problème de l'élimination des boues si ce type de station est retenu.

Même en l'absence d'une étude économique ces considérations conduisent à n'envisager cette solution qu'en tout dernier recours, si aucune autre possibilité existe.

Conclusion

Les industries de la canne à sucre sont à l'origine d'une pollution organique importante.

Cependant à l'image de ce qui se rencontre dans d'autres branches d'activité cette pollution peut être, par des aménagements internes et un soin apporté à l'exploitation, considérablement réduite. C'est le cas notamment des sucreries de cannes qui peuvent ne plus constituer pratiquement une source de pollution des eaux. Pour les distilleries, la situation est différente.

Malgré la réalisation d'opérations internes indispensables il restera toujours un effluent dont il faut se débarrasser. Les techniques (épandage, concentration) qui valorisent les éléments contenus dans cet effluent sont à rechercher de préférence aux autres. Si le rejet dans un cours d'eau est la seule solution possible, un déstockage contrôlé des effluents à partir de bassins suffisamment dimensionnés apparaît comme une solution acceptable. Enfin le traitement en station d'épuration est mal connu sur le plan technique et présentera en tout état de cause de très sérieuses difficultés d'exploitation.

Reçu pour publication en mai 1977.

Références bibliographiques

BIAGGI N., 1968. The sugar industry in Puerto Rico and its relation to the industrial waste problem 1967. *J.W.P.C.F.*, USA, **40**, 1423-1433.

DIRECTION DÉPARTEMENTALE DE L'AGRICULTURE DE LA RÉUNION. 1974. Étude sur les rejets des usines sucrières réunionnaises. 122 pages.

NOEL, J. C., 1974. Agence de Bassin Artois-Picardie — utilisation de l'eau et pollution. Moyens à mettre en œuvre et investissements à réaliser. 36 pages.

SHEA T. G., RAMOS E. Investigation of rum distillery slops. Treatment by anaerobic contact process. United States Environmental Protection Agency. 155-198.

Ann. Technol. agric., 1977, **26** (2), 225.

Chronique des livres

CHEFTEL J.-C., CHEFTEL H., BESANÇON P. — *Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments*, volume 2, 432 p. Paris, Technique et Documentation, 11, rue Lavoisier.

Avec ce second volume qui vient de paraître, l'Introduction à la Biochimie et à la Technologie des Aliments est maintenant un ouvrage complet. Ce livre de plus de 800 pages, comprenant de nombreuses illustrations et références bibliographiques devient l'auxiliaire obligatoire de tous ceux qui enseignent ou qui étudient la technologie des aliments. Ils apprécieront un texte clair et précis qui se suffit à lui-même pour être compris. La bibliographie a fait l'objet d'un choix particulièrement judicieux, puisqu'elle cite aussi bien des ouvrages plus spécialisés que des articles originaux ou des rapports établis par des organismes nationaux ou internationaux. La connaissance de la langue anglaise est indispensable si l'on veut accéder à ces compléments. Un lexique, donnant l'équivalent anglais des termes techniques employés dans l'ouvrage, faciliterait le travail de ceux qui ne sont pas encore familiers avec la terminologie de la technologie alimentaire.

On trouve dans le volume 2 des données technologiques qui concernent les procédés de conservation par le froid, par le chaud ou par le séchage et les emballages. La plus grande partie est consacrée à la qualité des aliments telle qu'elle peut être évaluée par des méthodes instrumentales ou sensorielles. Les aspects toxicologiques et nutritionnels sont largement traités. Le chapitre concernant l'aspect réglementaire de la qualité expose le système français et celui de la Communauté Économique Européenne.

Cet excellent ouvrage écrit et présenté d'une façon moderne vient combler une lacune. Les chercheurs, enseignants et étudiants lui ont déjà réservé un accueil enthousiaste et l'Université des Sciences et des Techniques du Languedoc s'honore de ne pas avoir négligé cette nouvelle spécialité universitaire.

P. DUPUY.

annales de technologie agricole

Trimestriel

1977

Vol. 26 - N° 3

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

Reproduction, même partielle, interdite sans autorisation des auteurs
et de l'Institut national de la Recherche agronomique
à l'exception des résumés

Ann. Technol. agric., 1977, **27** (3), 227-241.

Évolution comparée des fruits de deux cultivars de Melon « Doublon » et « Védrantais » (type « Charentais ») au cours des derniers jours de la maturation

R. DUMAS de VAULX*, S. AUBERT**

avec la collaboration technique de D. CHAMBONNET* et Irène URSELLA**

* *Station d'Amélioration des Plantes Maraîchères*
** *Station de Technologie des Produits Végétaux*
Centre de Recherches d'Avignon, I.N.R.A.
84140 Montfavet

Résumé

L'évolution des principaux facteurs de qualité des fruits des cultivars « Doublon » et « Vedrantais » (type « Charentais ») a été suivie au cours des dix derniers jours de maturation, dans deux conditions de culture différentes : sous serre verre chauffée, sous serre tunnel plastique non chauffée.

Le fruit a pratiquement atteint sa taille et son poids définitifs dix jours avant la maturité. Le poids spécifique du fruit augmente légèrement en fin de maturation, mais cette variation peu importante ne semble pas exploitable comme critère de maturité.

Les teneurs en matières sèches solubles, sucres, caroténoïdes colorés, augmentent de façon très importante dans les dix derniers jours de maturation. Ainsi dix jours avant la maturité la teneur en matières sèches solubles est de 5 p. 100, et le seuil de 12 p. 100 nécessaire pour avoir des fruits de qualité acceptable n'est atteint que 2 à 4 jours avant la maturité, selon les essais. Ainsi, les cueillettes trop précoces nuisent beaucoup à la qualité du fruit. L'acidité totale évolue peu mais elle a cependant tendance à augmenter en fin de maturation.

Le poids sec des graines augmente d'environ 50 p. 100 dans les dix derniers jours de maturation. Le taux de germination des semences déjà de l'ordre de 10 à 50 p. 100 pour les fruits cueillis dix jours avant maturité augmente rapidement par la suite.

A chaque cueillette avant maturité, un échantillon de fruits a été mis en conservation à la température ambiante (+ 25 °C) pendant une durée égale à celle prévue pour arriver à la maturité complète qu'auraient atteint les fruits restés sur la plante. La teneur en matières sèches solubles des fruits cueillis trop jeunes n'évolue pas au cours de la conservation. Par contre le métabolisme des caroténoïdes colorés évolue comme celui des fruits mûris sur la plante.

Mots clés : *Melon, taille, poids, sucres solubles, acidité, caroténoïdes, semences, évolution, maturation, qualité, conservation.*

Introduction

L'étude de la maturation des fruits de deux cultivars de type Charentais, cv. « Doublon » et « Vedrantais », a été entreprise sous deux aspects :

— évolution des principaux facteurs de qualité du fruit dans les derniers jours qui précèdent la maturité;

— évolution des fruits cueillis immatures et conservés à température ambiante.

Le choix du stade de cueillette est en effet une des difficultés rencontrées par les producteurs de melons. L'objectif principal de cette étude est donc de montrer l'influence du stade de cueillette sur la qualité des fruits. Ces observations complètent une étude précédente (DUMAS de VAULX, AUBERT, 1976) sur l'évolution des fruits du cv. « Doublon » cueillis à maturité et conservés à la température ambiante ou au froid à + 4 °C. Pour faciliter le lien entre ces deux études, des conditions culturales équivalentes, sous serres, ont été choisies. Comme dans l'étude précédente, nous ne cherchons pas à tirer des conclusions sur l'intérêt respectif de ces deux conditions de culture utilisées, celles-ci différant par de trop nombreux aspects.

A notre connaissance, peu d'études systématiques de la maturation des fruits de Melon se rapportent au type variétal « Charentais » le plus cultivé en France. On peut citer les travaux de COSTES (communication personnelle) qui a étudié la maturation des fruits du cv. « Doublon », en insistant surtout sur l'accumulation de la matière sèche dans les graines, en relation avec ses études sur les exigences en lumière et en gaz carbonique du Melon cultivé sous serre.

Sur les autres types variétaux, les études sont plus nombreuses. PRATT (1971) a suivi l'évolution des principales caractéristiques physiques et biochimiques du fruit, de l'anthèse à la maturité, des types « Cantaloupe » « Honeydew » cultivés aux États-Unis. En Israël, ZISMAN et TEMKIN-GORODEISKI (1975) ont étudié les échanges gazeux au cours de la maturation du cv. « Ogen ». Dans d'autres essais, ces mêmes auteurs ont montré en 1975 qu'il n'y avait pas toujours simultanéité du développement de la chair et de l'écorce du cv. « Honeydew Amid » selon les saisons de culture et les modes d'irrigation. Chez trois types variétaux de melons à chair orangée (« PMR 45 », « Crewshaw », « Persian ») REID *et al.* (1970) ont montré que les teneurs en chlorophylle et le betacarotène évoluaient de la même façon. Enfin TARRINGTON (1959) en étudiant l'influence de l'âge des fruits et des techniques d'extraction des semences sur le pourcentage de germination chez le cv. « PMR 45 » a montré que 20 jours avant la maturité les graines germaient déjà à environ 25 p. 100, le pourcentage augmentant régulièrement par la suite.

L'orientation principale de notre étude de la maturation se rapporte à l'évolution des caractéristiques de la chair mais aussi à celle des graines. En effet, les graines draînent une part importante de la matière sèche accumulée dans le fruit, ce qui peut modifier les biosynthèses dans les autres organes. Les mesures de fermeté de la chair et de dureté de l'écorce réalisées dans ces essais, associées à des mesures effectuées dans d'autres expérimentations, ont fait l'objet d'une étude particulière destinée à la mise au point d'un test non destructif de fermeté pour contrôler l'état de maturité et de conservation des melons (AUBERT, DUMAS de VAULX, 1977).

Matériel et méthodes

Matériel végétal et conditions de culture

Les deux cultivars de « Cantaloup Charentais » les plus cultivés sous serre : cv. « Doublon » (obtention I.N.R.A.) et « Vedrantais » (obtention VILMORIN) ont été placés dans deux conditions de culture :

— *Premier essai S.V.* : serre verre chauffée, plantation du 5 mars 1976, plantes palissées sur une branche, 2 plantes par m².

• Température de nuit : 16 °C; • Température de jour : 25-30 °C.

— *Deuxième essai T.P.* : serre tunnel plastique, plantation du 21 avril 1976, plantes à plat conduites sur deux branches, 2 plantes pour 3 m².

Sous serre tunnel plastique la température est moins facile à contrôler qu'en serre verre.

Au cours de notre essai T.P. on peut signaler quelques nuits assez fraîches (minima inférieurs à + 10 °C) juste après la plantation, et des pointes élevées de température (supérieure à + 40 °C) pendant la période de maturation.

Conditions d'étude de la maturation

Chronologiquement, nous avons procédé de la façon suivante :

• Au moment de la floraison, la date d'épanouissement des fleurs femelles a été repérée à l'aide d'étiquettes individuelles.

• Le stade de maturité adopté dans ces essais est le début de déhiscence du pédoncule du fruit.

• D'après les essais réalisés les années précédentes dans les mêmes conditions de culture, nous avons estimé la durée floraison-maturité à 40 jours pour l'essai S.V. et à 35 jours pour l'essai T.P.

• Les différentes cueillettes ont été réalisées tous les 2 jours en fonction de ces deux critères à partir du trentième jour après la floraison (essai S.V.) et du vingt septième jour (essai T.P.). A chaque cueillette on a prélevé 12 fruits dont 6 ont été analysés immédiatement et 6 mis en conservation à la température du laboratoire pendant une durée identique à celle (valeur estimée) prévue pour arriver à la maturité complète qu'aurait atteint le fruit resté sur la plante.

• En fin d'essai, la durée floraison-maturité réelle a été calculée. Les durées estimées se sont révélées exactes sauf pour les fruits du cv. « Vedrantais » de l'essai S.V. qui ont mis deux jours de plus que prévu (42 jours) pour arriver à maturité. Nous avons donc dû corriger les différents stades de cueillette pour ce cultivar dans l'essai S.V. : les fruits cueillis 30 jours après la floraison étaient en fait à 12 jours de la maturité et non à 10, etc. Dans l'essai de conservation, ces fruits du cv. « Vedrantais » de l'essai S.V. ont donc été analysés deux jours plus tôt que la date de maturité théorique.

Déterminations effectuées

a) *Mesures physiques*

En plus du poids du fruit, le diamètre équatorial a été mesuré à l'aide d'un pied à coulisse.

Le poids spécifique a été évalué par pesées avec et sans immersion dans l'eau à 20 °C environ selon la technique décrite par MACKEY, HARD et ZAEHRINGER (1973) et utilisée précédemment (DUMAS de VAULX, AUBERT, 1976).

b) *Teneur de la chair en matières sèches solubles*

Les mesures ont été réalisées à l'aide d'un réfractomètre à main (type O.P.L./SOPELEM, modèle 2310, 0 à 30 p. 100) en prélevant quelques gouttes de jus sur la partie de la chair consommable proche de la cavité des graines.

Ce mode de prélèvement, le plus usuel, donne des valeurs supérieures de 2 à 3 p. 100 par rapport à celles relevées sur l'ensemble de la pulpe homogénéisée (DUMAS de VAULX, AUBERT, 1976). Les fruits ayant une valeur de cet indice ponctuel inférieure à 10 p. 100 sont peu sucrés et de qualité médiocre ou mauvaise. Rappelons qu'un indice supérieur à 12 est souhaitable pour avoir une saveur sucrée agréable.

c) *Les mesures de sucres, totaux et réducteurs, de saccharose, des caroténoïdes et d'acidité* ont été réalisées selon le protocole décrit dans notre précédente publication (DUMAS de VAULX, AUBERT, 1976).

d) *La teneur en matière sèche des graines* avec embryon développé a été estimée sur des échantillons de 100 graines par fruit placés dans une étuve à 100-103 °C jusqu'à poids constant.

Les graines ont été extraites des fruits selon la méthode utilisée au laboratoire (macération dans de la pectinase pendant 24 heures), séchées et stockées 2 mois à la température ambiante avant le test de germination. Le pourcentage de germination a été estimé sur un échantillon de 20 graines par fruit analysé. Ces graines ont été semées dans des terrines contenant du terreau désinfecté à la vapeur et placées sur une tablette chauffante réglée à 25 °C. La germination a été notée 20 jours après le semis.

Résultats

Les résultats obtenus pour chaque cultivar, dans chacun des deux essais ont été regroupés sur la même figure pour faciliter les comparaisons. Autour de chaque point figure l'intervalle de confiance de la moyenne au seuil 5 p. 100.

La figure 1 représente l'évolution des poids moyens et celle du diamètre équatorial des fruits à chaque cueillette de l'essai S.V. (moyenne de 12 fruits par cultivar)

L'évolution du poids spécifique au cours de la maturation des fruits des deux cultivars dans chacun des deux essais est résumée par la figure 2.

La figure 3 permet de comparer les courbes d'évolution de la teneur en matières sèches solubles, mesurée au réfractomètre, au cours de la maturation et au cours de la conservation à 25 °C des fruits cueillis immatures.

Les teneurs en sucres du jus extrait des fruits aux différents stades de cueillette sont rapportées à la figure 4.

La figure 5 montre l'augmentation des pigments caroténoïdes totaux donnant la couleur orangée à la chair consommable, les analyses sont faites immédiatement après la cueillette.

L'évolution de l'acidité totale et de l'acidité libre est représentée à la figure 6.

La figure 7 résume l'évolution de la teneur en matières sèches des lots de 100 graines et du pourcentage de germination au cours de la maturation. Ces mesures n'ont pu être réalisées de façon complète que dans le premier essai S.V.

Discussion

1. — *Évolution du poids du fruit, du diamètre équatorial et du poids spécifique*

Le poids du fruit et le diamètre équatorial n'évoluent pas significativement au cours des 10 et 12 derniers jours de maturation dans le premier essai S.V. (fig. 1) pour chaque cultivar. Pour alléger la présentation, les résultats de l'essai T.P. n'ont

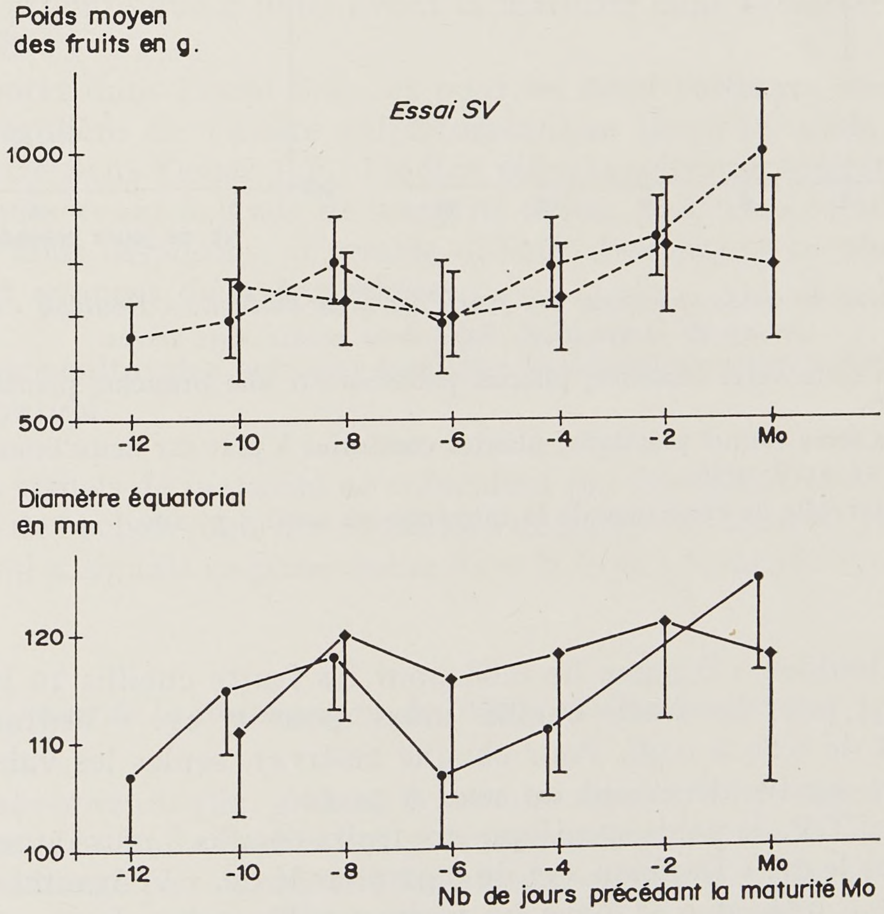


FIG. 1. — *Évolution du poids et du diamètre équatorial du fruit des cultivars « Doublon » et « Vedrantais » au cours des derniers jours de maturation dans l'essai S.V.* (*sous serre verre chauffée, plantes palissées sur une branche, plantation du 5 mars 1976*).

♦ « Doublon ».
• « Vedrantais ».
- - - - Poids moyen du fruit.
——— Diamètre équatorial.
I ± l'intervalle de confiance de la moyenne au seuil 5 p. 100.

pas été présentés car aucune différence significative n'a été observée pour ces deux caractères.

Ainsi le rendement pondéral est pratiquement assuré dix jours avant la maturité et le stade de cueillette ne jouera que sur la qualité des fruits, comme nous le verrons plus loin.

Le poids spécifique augmente, mais dans de faibles proportions au cours des 10 derniers jours de maturation, comme le montre la figure 2. Dans l'essai S.V.,

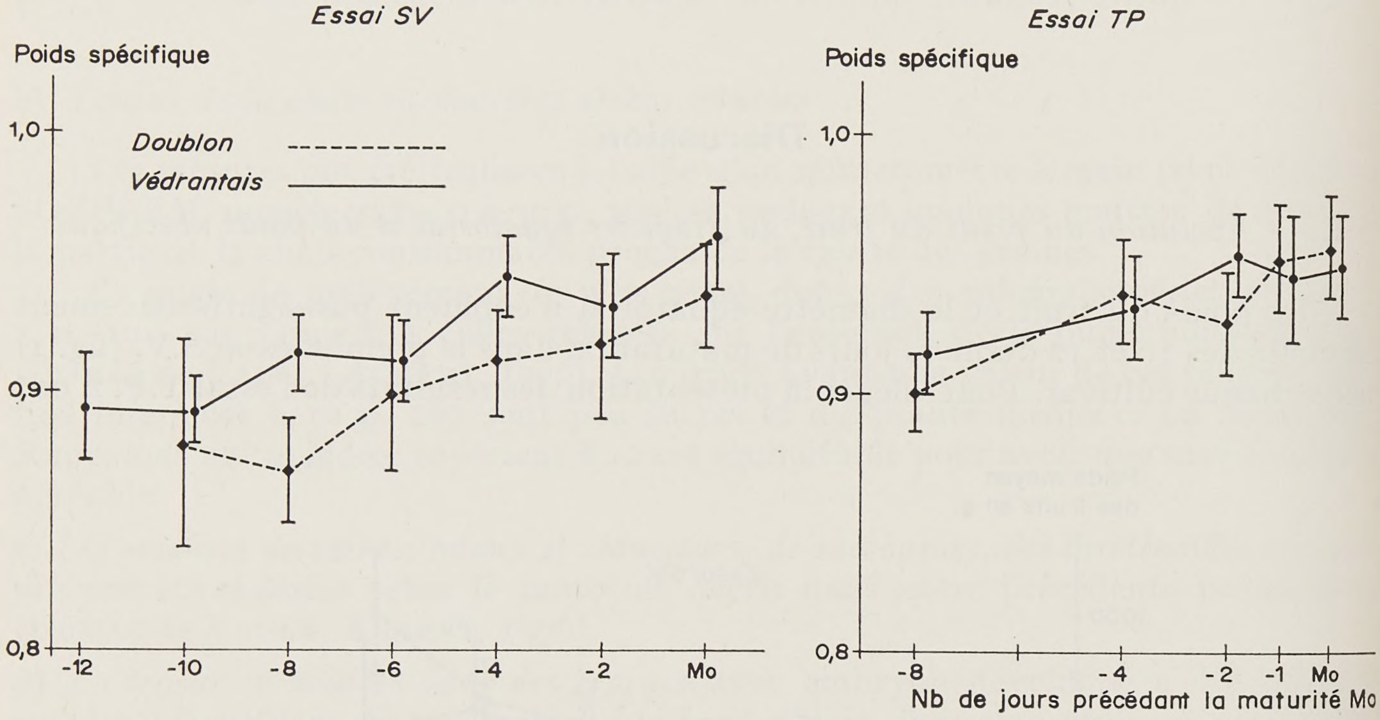


FIG. 2. — *Évolution du poids spécifique des fruits des deux cultivars « Doublon » et « Vedrantais » en fin de maturation, dans deux essais sous serres.*

Essai S.V. : sous serre verre chauffée, plantes palissées sur une branche, plantation du 5 mars 1976.
Essai T.P. : sous serre tunnel plastique, plantes conduites à plat sur deux branches, plantation du 21 avril 1976.
Ī ± l'intervalle de confiance de la moyenne au seuil 5 p. 100.

pour le cv. « Doublon » il passe de 0,88 pour les fruits cueillis 10 jours avant la maturité à 0,94 pour les fruits cueillis mûrs, pour le cv. « Vedrantais » il passe respectivement de 0,89 à 0,96. Pour chaque cultivar, seules les valeurs extrêmes sont différentes significativement au seuil 5 p. 100.

Dans l'essai T.P., le poids spécifique des fruits cueillis 8 jours avant la maturité est de 0,90 pour le cv. « Doublon » et de 0,92 pour le cv. « Vedrantais », et il passe respectivement à 0,96 et 0,95 pour les fruits cueillis mûrs. Là encore, seules les valeurs extrêmes sont significativement différentes au seuil 5 p. 100.

Cette variation peu importante du poids spécifique au cours de la maturation ne semble pas exploitable dans la pratique comme critère de maturité ou pour trier des lots de fruits cueillis à divers stades pour un même cultivar et pour une culture déterminée.

Le poids spécifique varie aussi selon les cultivars et les conditions de culture. Dans l'essai S.V., le poids spécifique du cv. « Doublon » est toujours inférieur à

celui du cv. « Vedrantais », seuls les écarts les plus importants sont significatifs. Par contre, dans l'essai T.P., les poids spécifiques des deux cultivars sont très proches et non significativement différents.

2. — *Évolution de la teneur en matières sèches solubles mesurée au réfractomètre*

• *Évolution au cours de la maturation sur plante*

L'indice réfractométrique progresse de façon importante dans les dix derniers jours de maturation (fig. 3). Ainsi, dans l'essai S.V., l'indice évolue de 5, ceci 10 jours avant la maturité, à 13 arrivé à maturité. De même dans l'essai T.P. l'indice progresse de 7,5 à 13 dans les 8 derniers jours de maturation. Cependant tout au long de la maturation l'indice réfractométrique de l'essai T.P. est plus élevé que celui de l'essai S.V. à stade de cueillette équivalent.

Si l'on considère qu'en dessous d'un indice réfractométrique de 10, mesuré ponctuellement autour du placenta, tous les fruits sont de mauvaise qualité, seuls les fruits cueillis au stade maturité moins 3 jours pour l'essai S.V., et maturité moins 6 jours pour l'essai T.P., ont franchi ce seuil. La valeur 12 d'indice réfractométrique n'est atteinte que 2 jours avant la maturité dans l'essai S.V., et 4 jours dans l'essai T.P.

On peut noter dans l'essai S.V., et pour les deux cultivars, une progression constante et régulière de l'indice réfractométrique jusqu'au stade de maturité choisi. Par contre dans l'essai T.P., l'indice réfractométrique atteint sa valeur la plus élevée 2 jours avant le stade de maturité défini, puis reste constant. Avec les éléments dont nous disposons, il semble difficile d'expliquer ce phénomène. On peut cependant avancer deux hypothèses :

— Les conditions culturales peuvent modifier le déroulement des dernières phases de la maturation.

— Les critères visuels de maturité ne coïncident pas forcément avec le même état de maturité de la chair dans des conditions de milieu différentes. TEMKIN-GORODEISKI (1975) a signalé ce phénomène dans le type « Honeydew ».

• *Évolution au cours de la conservation des fruits cueillis immatures*

Les résultats obtenus (fig. 3) dans le premier essai S.V., montrent que l'indice réfractométrique des fruits cueillis les plus immatures (12, 10, 8, 6 jours avant la maturité) ne change pas significativement au cours de la conservation à température ambiante. Par contre, dans ce même essai S.V., on note une progression plus ou moins importante de cet indice pour les fruits cueillis 4 et 2 jours avant la maturité optimale. On ne retrouve pas ce dernier phénomène dans l'essai T.P. où au contraire on observe une diminution de l'indice réfractométrique, baisse attribuable à un catabolisme élevé après la récolte.

Les fruits cueillis trop jeunes ont des teneurs en matières sèches solubles faibles et qui n'augmentent pas au cours de la conservation. Les cueillettes trop précoces sont donc très néfastes sur le plan de la qualité des fruits.

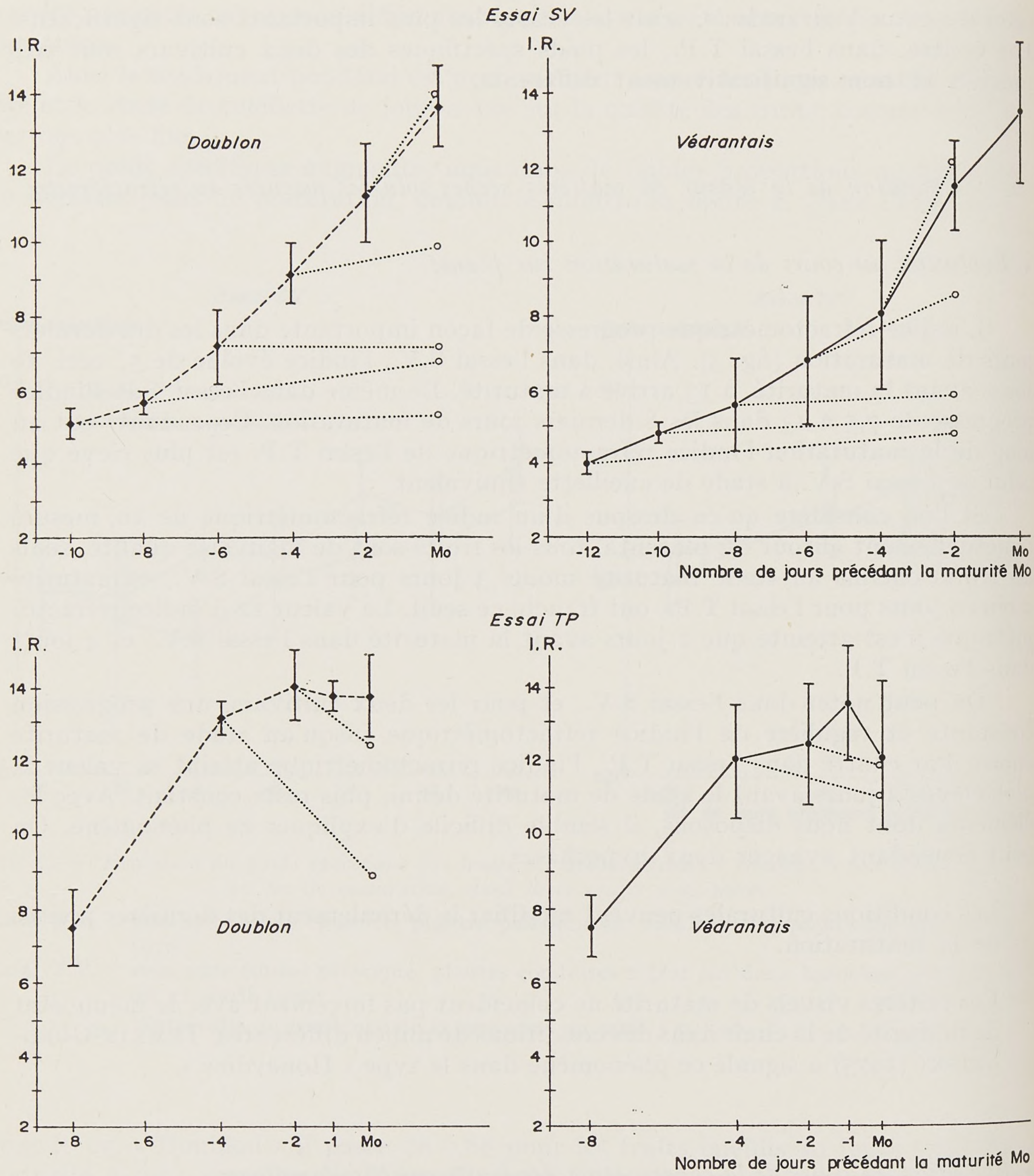


FIG. 3. — *Évolution comparée de l'indice réfractométrique mesuré sur la chair, dans la zone proche de la cavité des graines, au cours de la maturation des fruits des cultivars « Doublon » et « Vedrantais » dans deux essais sous serres.*

◊———◊ cv. Doublon.
•———• c.v. Vedrantais. } Mesures effectuées le jour même de la cueillette.

○ Mesures effectuées sur les fruits cueillis immatures et conservés à + 25 °C pendant une durée identique à celle (théorique) prévue pour arriver à maturité si le fruit était resté sur la plante.

I ± l'intervalle de confiance de la moyenne au seuil 5 p. 100.

3. — *Évolution des sucres*

• La teneur en sucres totaux augmente régulièrement dans les 10 derniers jours de maturation comme le montre la figure 4. Cette évolution est parallèle mais

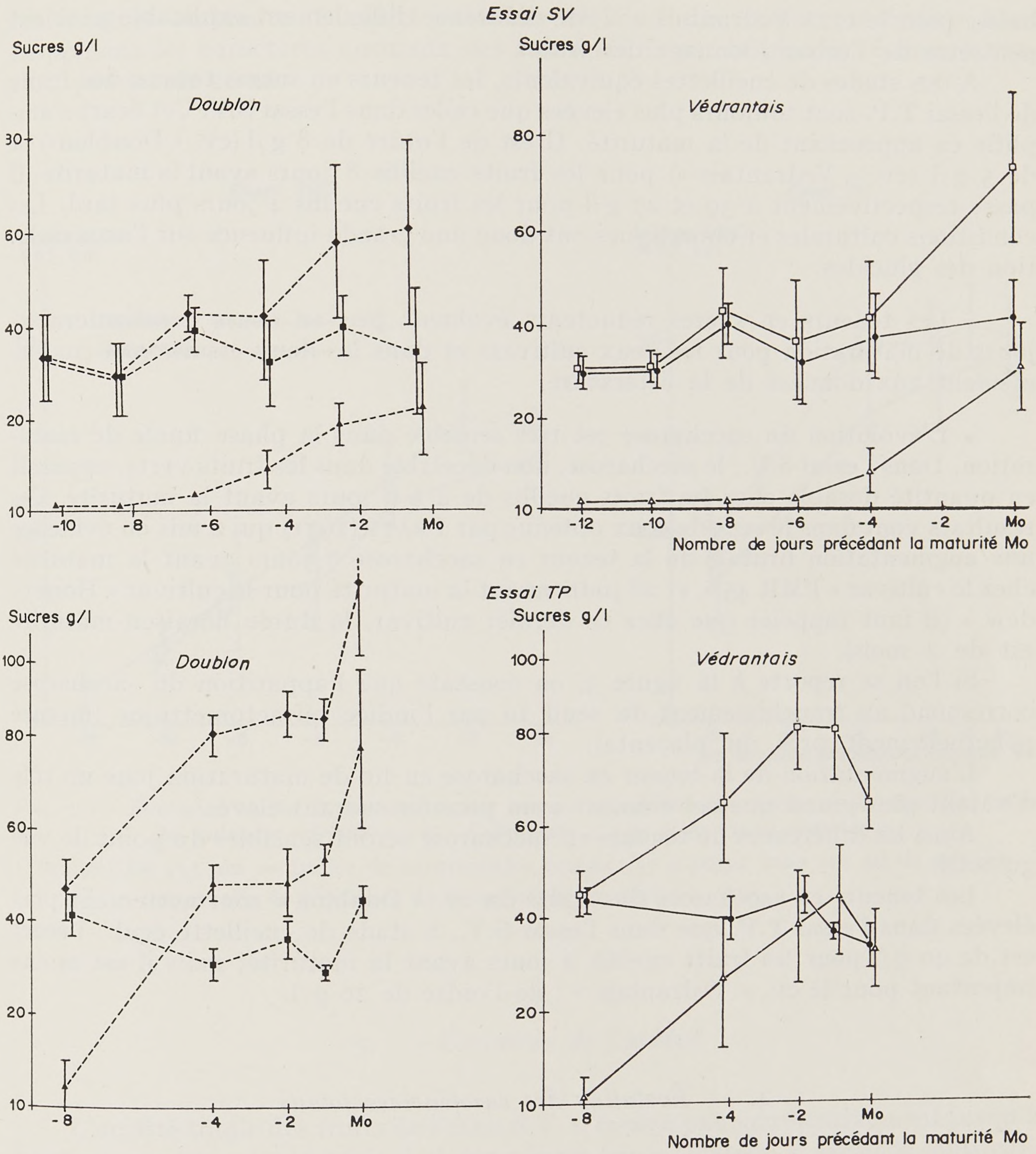


FIG. 4. — *Évolution des teneurs en sucres des fruits des cultivars « Doublon » et « Vedrantais » en fin de maturation au cours de deux essais sous serres.*

♦ - - - - - - - ♦ Sucres totaux. ■ - - - - - - - ■ Sucres réducteurs. ▲ ——— ▲ Saccharose. } Doublon

□ ——— □ sucres totaux ■ ——— ■ sucres réducteurs △ ——— △ saccharose } Vedrantais

Ī ± l'intervalle de confiance de la moyenne au seuil 5 p. 100.

moins régulière que celle de l'indice réfractométrique étudiée précédemment. Nos résultats concordent avec ceux de PRATT (1971) sur les cultivars « PMR 45 » et « Honeydew » cultivés aux États-Unis.

Pour ce caractère, les deux cultivars comparés « Doublon » et « Vedrantais » évoluent très parallèlement dans chacun des deux essais S.V. et T.P. sauf pour les fruits cueillis les plus mûrs de l'essai T.P. où les teneurs en sucres totaux des deux cultivars diffèrent sensiblement : hausse rapide pour le cv. « Doublon », mais

baisse pour le cv. « Vedrantais ». Cette différence difficilement explicable provient peut-être de l'échantillonnage des fruits.

A des stades de cueillettes équivalents, les teneurs en sucres totaux des fruits de l'essai T.P. sont toujours plus élevées que celles dans l'essai S.V. Cet écart s'amplifie en approchant de la maturité. Il est de l'ordre de 8 g/l (cv. « Doublon») et de 5 g/l (cv. « Vedrantais ») pour les fruits cueillis 8 jours avant la maturité. Il passe respectivement à 39 et 27 g/l pour les fruits cueillis 4 jours plus tard. Les conditions culturales et climatiques ont donc une grande influence sur l'accumulation des glucides.

• Les teneurs en sucres réducteurs évoluent peu au cours des dix derniers jours de maturation pour les deux cultivars et dans les deux essais, ceci conformément aux données de la littérature.

• L'évolution du saccharose est très sensible dans la phase finale de maturation. Dans l'essai S.V., le saccharose, non décelable dans les fruits verts, apparaît en quantité dosable chez les fruits cueillis de 4 à 6 jours avant la maturité. Ces résultats vont dans le sens de ceux obtenus par PRATT (1971) qui a mis en évidence une augmentation brutale de la teneur en saccharose 7 jours avant la maturité chez le cultivar « PMR 45 », et 28 jours avant la maturité pour le cultivar « Honeydew » (il faut rappeler que chez ce dernier cultivar, la durée floraison-maturité est de 2 mois).

Si l'on se reporte à la figure 3, on constate que l'apparition du saccharose correspond au franchissement du seuil 10 par l'indice réfractométrique (mesuré ponctuellement près du placenta).

L'augmentation de la teneur en saccharose en fin de maturation joue un rôle d'autant plus grand que cet élément a un pouvoir sucrant élevé.

Ainsi les différences de teneurs en saccharose seront sensibles du point de vue gustatif.

Les teneurs en saccharose des fruits du cv. « Doublon » sont nettement plus élevées dans l'essai T.P. que dans l'essai S.V., à stade de cueillette égal : l'écart est de 40 g/l pour les fruits cueillis 2 jours avant la maturité; mais il est moins important pour le cv. « Vedrantais » : de l'ordre de 20 g/l.

4. — *Évolution des caroténoïdes totaux*

La teneur en caroténoïdes totaux augmente régulièrement au cours des derniers jours de maturation (fig. 5). Les teneurs faibles en caroténoïdes mesurées dans la chair des fruits cueillis 10 jours avant la maturité correspondent à une coloration d'aspect blanc verdâtre. Une teinte légèrement rosée est observée sur les fruits cueillis deux jours plus tard (Mo-8). Ensuite la couleur prend une teinte plus orangée d'intensité croissante avec la maturation.

Les mesures de teneurs en caroténoïdes des lots de fruits cueillis immatures et conservés à la température ambiante jusqu'à leur date théorique de maturité n'ont pas pu être effectuées. Nous avons dû nous limiter à l'observation visuelle de la coloration de la chair. Les fruits cueillis immatures observés après conservation ont présenté une coloration orangée de la chair pratiquement semblable aux témoins mûris sur la plante. Ainsi dans les fruits cueillis moins de 10 jours avant la maturité, les précurseurs des caroténoïdes colorés sont présents et leur métabolisme semble se dérouler normalement au cours de la conservation à la

température ambiante. L'aspect extérieur de ces fruits immatures évolue aussi en prenant les caractères normaux des fruits mûris sur la plante : écorce jaune-vert, pédoncule cerné.

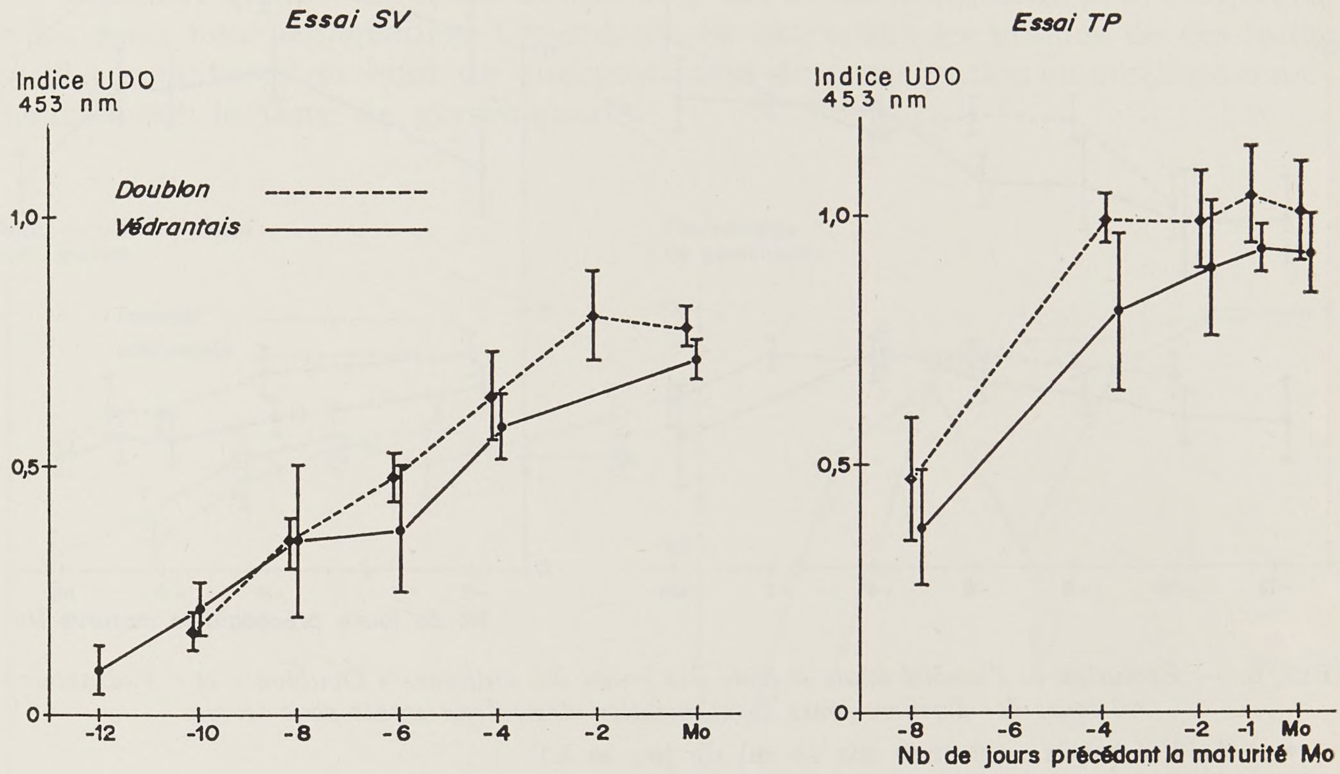


FIG. 5. — *Évolution en fin de maturation des teneurs en caroténoides totaux de la chair des fruits des cultivars « Doublon » et « Vedrantais », dans deux essais sous serres.*

Indice UDo 453 nm = Indice de carotenoides totaux (30 g pulpe dans 200 ml de solvant.

] ± l'intervalle de confiance de la moyenne au seuil 5 p. 100.

5. — *Évolution de l'acidité*

L'acidité totale des fruits de l'essai S.V. n'évolue pas significativement jusqu'à quatre jours (cv. « Vedrantais ») et deux jours (cv. « Doublon ») avant la maturité. Pour les deux dernières cueillettes de chaque cultivar, on a observé une augmentation significative de l'acidité totale par rapport aux cueillettes plus précoces (fig. 6).

Dans l'essai T.P., l'acidité totale augmente entre les cueillettes — 8 et — 4 jours avant la maturité, puis passe par une sorte de plateau et baisse significativement pour les fruits cueillis mûrs, ceci pour les deux cultivars (fig. 6). Cette évolution de l'acidité totale en fin de maturation est à rapprocher de celles des sucres et de l'indice réfractométrique vues précédemment et pourrait avoir les mêmes explications.

L'acidité libre évolue peu au cours des derniers jours de maturation dans l'essai S.V., elle aurait plutôt tendance à augmenter, et à baisser dans l'essai T.P., mais les écarts ne sont pas significatifs. Dans les deux essais, on note cependant une baisse significative de l'acidité libre pour les fruits cueillis mûrs.

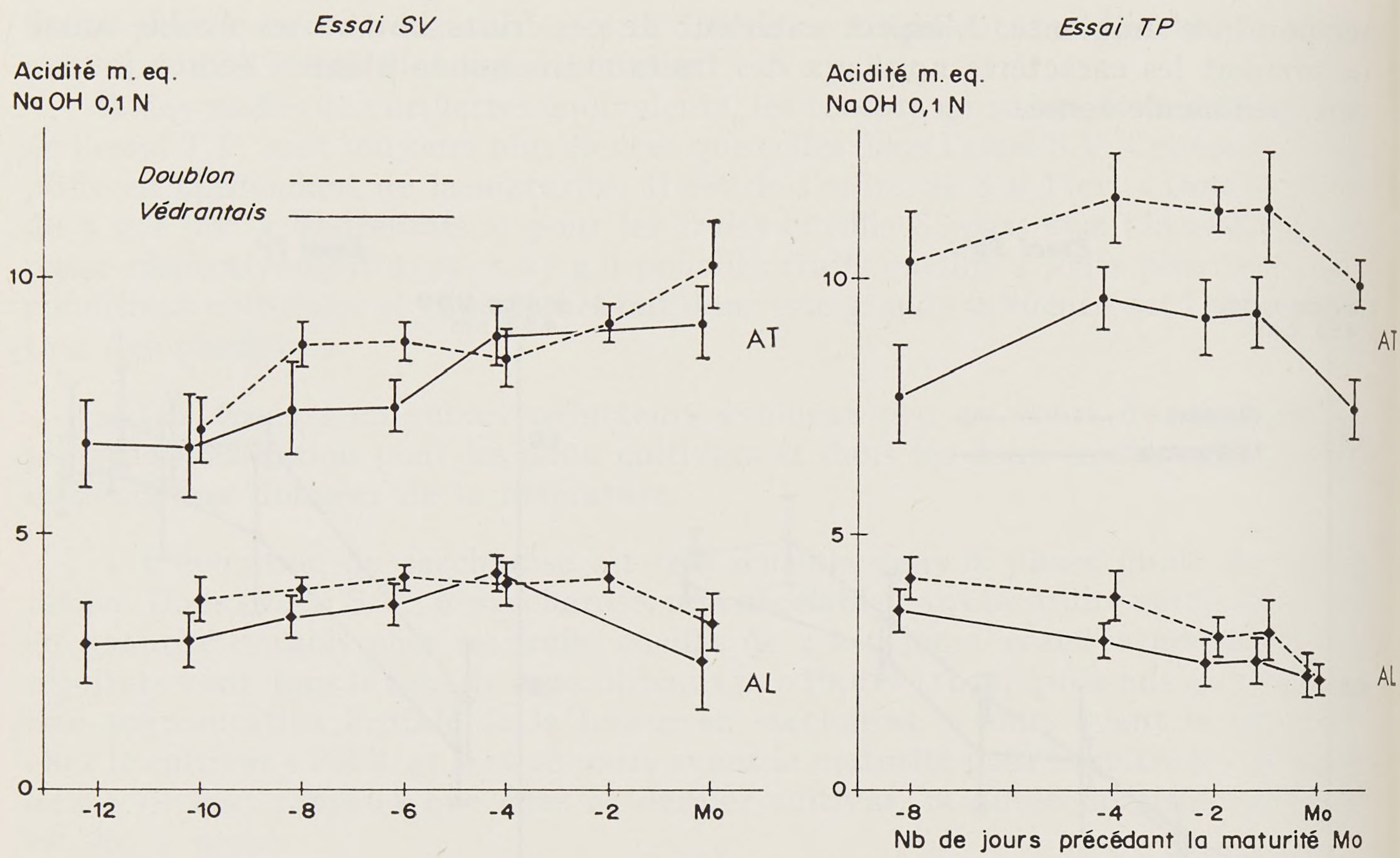


FIG. 6. — *Évolution de l'acidité totale et libre des fruits des cultivars « Doublon » et « Vedrantais » au cours des derniers jours de maturation dans deux essais sous serres.*

• Acidité totale : mesurée sur 20 ml de jus. = AT

♦ Acidité libre : mesurée sur 10 ml de jus. = AL

⌶ ± l'intervalle de confiance de la moyenne au seuil 5 p. 100.

6. — *Évolution de la teneur en matière sèche et du taux de germination des graines*

Pour compléter cette étude de la maturation, il nous a semblé utile de suivre aussi l'évolution des graines. Dans la pratique, on est amené à semer des graines provenant de fruits incomplètement mûrs et il nous a semblé intéressant de suivre l'évolution des taux de germination des semences.

• La teneur en matière sèche des graines augmente moins que ce que l'on attendait dans les dix derniers jours de maturation (fig. 7). Pour des échantillons de 100 graines, elle passe quand même de 2 à 3 g dans les dix derniers jours de maturation. Cette évolution est très semblable pour les deux cultivars.

• Le développement des graines est confirmé par les résultats des essais de germination de l'essai S.V. (fig. 7). Aucun échantillon n'a eu un taux de germination nul. Les graines provenant des fruits les plus jeunes, 10 et 12 jours avant la maturité, ont levé avec un pourcentage faible en moyenne (10 à 60 p. 100). Les autres lots ont germé à plus de 90 p. 100 exception faite du lot de « Vedrantais » à maturité moins 6 jours (55 p. 100). Il s'agit d'une anomalie dont on ne peut pas préciser les causes.

Nous n'avons pas fait figurer les taux de germination des graines provenant

des fruits cueillis immatures et mis en conservation jusqu'à leur maturité théorique. Tous les lots de graines ont germé à des taux supérieurs à 95 p. 100.

Tous les lots de graines provenant de l'essai T.P. ont germé à des taux supérieurs à 90 p. 100, sauf pour le lot de fruits du cv. « Doublon » cueillis 8 jours avant la maturité qui a germé à 73 p. 100.

Ainsi, les graines des fruits cueillis 10 jours avant la maturité peuvent germer à des taux non négligeables. Cependant, en extrayant les graines de ces fruits cueillis immatures au bout de quelques jours de conservation on améliore considérablement le taux de germination.

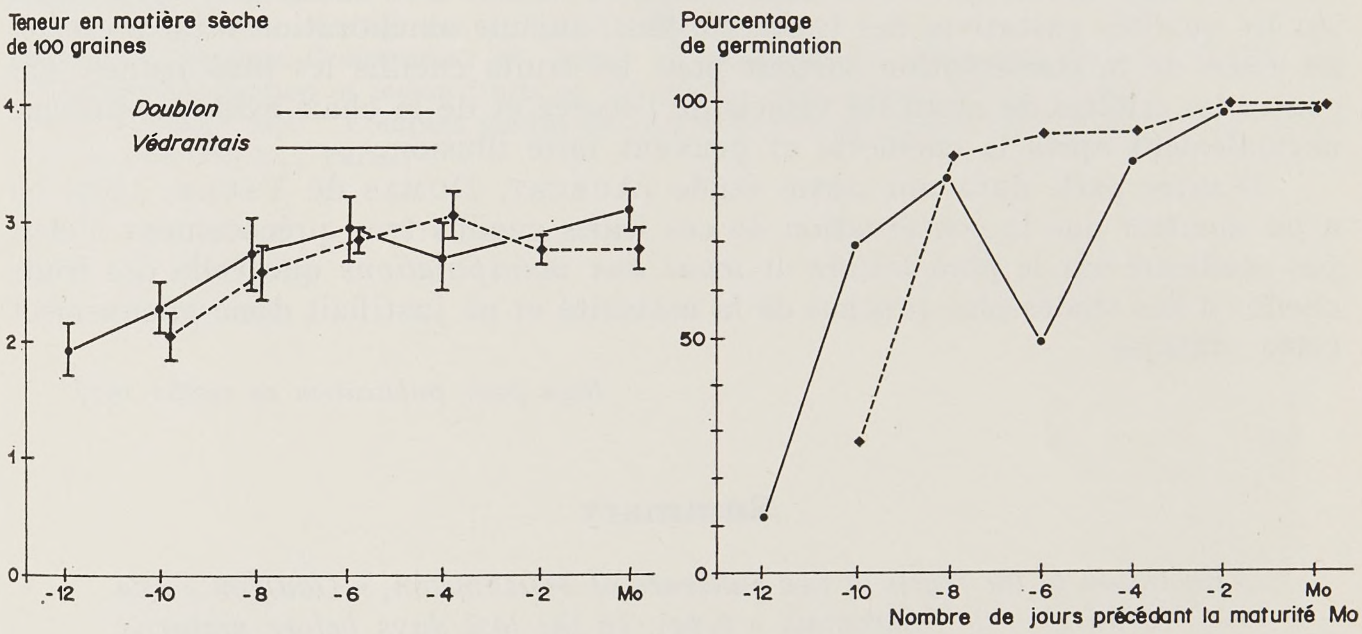


FIG. 7. — *Évolution de la teneur en matière sèche de 100 graines et du pourcentage de germination dans les derniers jours de maturation chez les cultivars « Doublon » et « Vedrantais » dans l'essai en serre verre chauffée.*

⌈ ± l'intervalle de confiance de la moyenne au seuil 5 p. 100.

Conclusion

Ces essais, en montrant l'évolution de certaines caractéristiques du fruit au cours des derniers jours de maturation, permettent de tirer quelques conclusions pratiques, notamment sur l'influence du stade de cueillette sur la qualité des fruits.

L'indice réfractométrique, critère usuel de qualité, passe de 5 à 13 p. 100 dans les dix derniers jours de maturation. Cet indice atteint la valeur minimale acceptable 10 seulement 4 à 5 jours avant la maturité et la valeur satisfaisante 12 est atteinte deux jours plus tard. L'indice réfractométrique des fruits cueillis trop jeunes, n'augmente plus une fois le fruit détaché de la plante. L'évolution de la teneur en sucres totaux est très parallèle à celle de l'indice réfractométrique, ce qui confirme une fois de plus l'intérêt de ce critère général de qualité.

L'apparition de saccharose dans le fruit se fait tardivement, de l'ordre de 5 à 6 jours avant la maturité selon les essais. Cette apparition se situe d'après nos résultats à une date légèrement antérieure à celle où l'indice réfractométrique atteint la valeur 10. L'augmentation de la teneur en saccharose dans la phase

finale de la maturation est importante du point de vue gustatif car ce sucre a un pouvoir sucrant élevé.

Dans notre période d'étude de la maturation, il semble que le métabolisme des caroténoïdes ne soit pas perturbé par une cueillette précoce et qu'il continue à évoluer à température ambiante (20-25 °C) en faveur de pigments orangés (lycopène) donnant une bonne coloration à la chair.

La teneur en matière sèche des graines augmente de 50 p. 100 environ dans les 10 derniers jours de maturation. Ces graines peuvent germer à des taux non négligeables pour des fruits relativement jeunes (moins 12 jours avant la maturité) et à des taux élevés à partir de 8 jours avant la maturité.

Ces essais ont donc montré l'influence très néfaste de cueillettes trop précoces sur les qualités gustatives des fruits; de plus, aucune amélioration n'est à espérer au cours de la conservation surtout pour les fruits cueillis les plus jeunes. Par contre les critères de maturité visuels de l'écorce et de la chair évoluent presque normalement après la cueillette et peuvent faire illusion.

D'autre part, dans une autre étude (AUBERT, DUMAS de VAULX, 1977) on a pu montrer que la conservation de ces fruits cueillis trop précocement n'était pas meilleure sur le plan *texture* et *tenue aux manipulations* que celle des fruits cueillis à des stades plus proches de la maturité et ne justifiait donc aucunement cette pratique.

Reçu pour publication en juillet 1977.

Summary

Evolution of the fruits of two cultivars of Muskmelon, « Doublon » and « Vedrantais » (« Charentais » type), in the last days before maturity

The evolution of the main factors of quality during the last days before maturity was studied on two cultivars, « Doublon » and « Vedrantais », (« Charentais » type) under two greenhouse conditions.

The fruit did not enlarge during this period, but the specific gravity increased weakly.

The soluble solids, sugars and carotenoids contents increased strongly during the last days before maturity, and the fruit harvested too early were of bad quality. Ten days before maturity the rate of soluble solid was near 5 p. 100, and reached 12 p. 100 (level necessary for acceptable fruit quality) only 2 or 4 days before maturity according to the trials. The acidity did not change significantly.

The dry weight of the seeds increased of about 50 p. 100 in the last ten days of maturation. The seeds could germinate ten days before maturity with a rate of 10 to 50 p. 100, and with higher rates later.

At each harvest a sample of fruits was stored at room temperature (+ 25 °C) during the number of days necessary to reach maturity if these fruits had been left on the plant. In these fruits, the soluble solids content did not change during the storage, but the metabolism of the coloured carotenoids was near the same as in the fruits matured on the plant.

Key-words: *Muskmelon, size, weight, soluble sugars, acidity, carotenoids, seeds évolution, maturation quality.*

Références bibliographiques

AUBERT S., DUMAS de VAULX R., 1977. Test de fermeté non destructif pour contrôler la maturité du Melon *Ann. Technol. Agric.*, **27** (3), 243-254.

COSTES C. Communication personnelle.

DUMAS de VAULX R., AUBERT S., 1976. Caractères biochimiques, qualité et aptitude à la conservation de Melons (« Cantaloup Charentais », cv. « Doublon ») cultivés sous serres. *Ann. Technol. Agric.*, **25** (4) 309-336..

MACKEY A. C., HARD M. M., ZAEHRINGER M. V., 1973. Measuring textural characteristics of fresh fruits and vegetables, apples, carrots, cantaloupe. Agric. Experim. Station Oregon State University. *Techn. Bull.*, **123**, 39 p.

PRATT H. K., 1971. The biochemisty of fruits and their products. Chap 5 : Melons in HULME A. C., *Edit. Academic Press*, New York, London, **2**, 207-232.

REID M. S., LEE T. H., PRATT H. K., CHICHESTER C. O., 1970. Chlorophyll and carotenoid changes in developing muskmelons. *Am. Soc. Hortic. Sci.*, **95** (6), 814-815.

RISSER G., 1969 à 1972. Rapports d'activité de la Station d'Amélioration des Plantes Maraîchères d'Avignon-Montfavet. I.N.R.A., Centre de Recherches Agronomiques d'Avignon, 84140 Montfavet.

TARRINGTON J. F., 1959. Effect of fruit maturity and harvesting methods on germination of muskmelon. *Proc. Am. Hortic. Sci.*, **73**, 422.

TEMKIN-GORODEISKI N., 1975. Influence de la saison de culture et du mode d'irrigation sur la maturation de Melons de la variété « Honeydew Amid ». Facteurs et régulation de la maturation des fruits. *Colloq. Int. C.N.R.S.*, **238**, 93-96.

ZISMAN U., TEMKIN-GORODEISKI N., 1975. A technique for measuring the rate of CO_2 and ethylene production of melon fruits on the plant. *Hortscience*, **10** (4), 425-426.

ZUANG H., 1973-1976. Comptes rendus du groupe de travail « Qualité des légumes frais ». Rapports INVUFLEC, Paris.

Ann. Technol. agric., 1977, **27** (3), 243-254.

Test de fermeté non destructif pour contrôler la maturité du melon

S. AUBERT*, R. DUMAS de VAULX**,

avec la collaboration technique de D. CHAMBONNET et Irène URSELLA

* *Station de Technologie des Produits Végétaux*
** *Station d'Amélioration des Plantes Maraîchères*
Centre de Recherches Agronomiques d'Avignon, I.N.R.A.,
84140 Montfavet

Résumé

Cette expérimentation porte sur deux cultivars du type *Charentais*, cv. « Doublon » et cv. « Vedrantais », provenant de deux plantations en serres différentes.

La dureté de l'écorce du melon est mesurée avec l'aide d'un appareil SHORE en évitant la perforation de l'épiderme. Cet indice traduit bien les modifications internes de la fermeté de chair sur les fruits proches de la maturité optimale et en cours de conservation; ceci en accord avec les mesures faites au pénétromètre directement sur une coupe.

L'incidence de cueillettes prématurées sur la qualité de texture est abordée sur des melons conservés dans les conditions ambiantes (20 à 25 °C).

Mots clés : *Melon, qualité, maturation, texture, dureté, conservation.*

Introduction

La fermeté de la chair du melon, mesurée au pénétromètre, est un des meilleurs critères du catabolisme d'un fruit mûr en cours de conservation ou de commercialisation. Ce caractère intervient dans la qualité gustative, plus particulièrement pour des fruits surmûris ayant une texture trop molle (YAMAGUCHI et al., 1977).

Dans une publication précédente (DUMAS de VAULX, AUBERT, 1976) nous avons montré que ce facteur de la qualité organoleptique est complémentaire de la teneur en matières sèches solubles, exprimée par l'indice réfractométrique de la pulpe consommable. Ce dernier critère est, pour sa part, représentatif de la saveur sucrée; mais il évolue faiblement dans la conservation des fruits à température ambiante (20 à 25 °C).

Ces deux indices classiques utilisables pour la sélection variétale ou pour le tri des récoltes, ont pour inconvénient majeur de nécessiter une coupe ou une ouverture dans le fruit. Éventuellement, une mesure ponctuelle d'indice réfracto-

métrique est envisageable. Dans le cas du pénétromètre, plusieurs déterminations doivent être faites sur un même individu, une dizaine dans un plan équatorial, compte tenu de leur variabilité importante dans des zones de chair comparables. De plus, ce caractère destructif ne permet pas de suivre l'évolution individuelle des fruits en cours de maturation sur la plante, ni leur conservation après récolte.

Des mesures de dureté périphérique ont été proposées pour préciser l'état de maturité d'autres fruits. Mais, l'utilisation d'un pénétromètre, même miniaturisé, provoque des blessures ouvertes pouvant perturber les métabolismes normaux sur la plante. Toutefois, quelques résultats encourageants obtenus sur la pêche montrent que cette détermination est néanmoins possible *in situ*, avec de multiples précautions dans les manipulations (MONET, BASTARD, CAMPOY, 1974). Ces auteurs distinguent ainsi trois phases dans le développement et la maturation des pêches. Un maximum de dureté se situerait à la fin des divisions cellulaires du jeune fruit. Pendant la croissance la dureté diminue lentement, puis baisse rapidement aux approches de la maturité optimale. Un seuil de fermeté approximatif est donné pour apprécier la date de récolte idéale de quelques cultivars de pêches.

Sur le melon, nous avons abordé la mise au point d'un test non destructif à partir d'un appareillage simple, commode et très accessible : le Duromètre SHORE. Ces essais visent à substituer aux mesures de fermeté dans la chair celles sur l'écorce. En effet, cette zone sous épidermique évolue sensiblement en cours de maturation. On observe une diminution relative de l'épaisseur d'écorce non consommable pour les fruits les plus mûrs. De même, la déformabilité du fruit au niveau de l'attache pistillaire est aussi un indice manuel, seulement perceptible pour des fruits ayant atteint un ramollissement interne souvent excessif. A notre connaissance, ces critères éventuels n'ont pas fait l'objet de mesures objectives précises et non destructives.

Les indices de récoltes usuels les plus utilisés restent empiriques et aléatoires. La déhiscence du pédoncule et le dessèchement de la feuille de « garde », la plus proche du fruit, sont de bons repères; mais ces caractères sont propres à certains cultivars et varient entre les récoltes d'une même culture (peu visibles en fin de saison). Dans la pratique la plus courante, les cueillettes se font précocement, plusieurs jours avant maturité complète, et ceci, sans repères objectifs; d'où la présence sur les marchés de melons cueillis trop verts et de qualité très médiocre (DUMAS de VAULX, AUBERT, 1977).

Ainsi le but de notre travail sera de vérifier l'intérêt du critère dureté de l'écorce pour suivre la maturation et la conservation de melons provenant de modes culturaux différents; ceci en confrontant cette mesure avec l'indice de fermeté interne de la chair.

Matériel et méthodes

Matériel végétal et conditions de culture

L'étude principale porte sur deux cultivars de Melons, du type *Cantaloup charentais*, cv. « Doublon » (*) et cv. « Vedrantais » (**), placées dans deux conditions de cultures.

(*) Obtention I.N.R.A.
(**) Obtention VILMORIN.

Premier essai (S.V.) : sous serre verre chauffée; plantation du 5 mars 1976; plantes palissées sur une branche; densité 2 plantes par m².

Second essai (T.P.) : sous serre tunnel plastique; plantation du 21 avril 1976; plantes à plat sur deux branches; densité 2 plantes pour 3 m².

Quelques mesures ont été aussi réalisées sur des fruits du cultivar « Doublon » provenant d'une culture automnale sous serre verre : plantation 23 juillet 1975; plantes palissées sur une branche; 2 plantes par m².

Échantillonnage

Nous avons montré précédemment (DUMAS de VAULX, AUBERT, 1976) qu'un lot de 6 fruits est généralement suffisant pour caractériser une récolte assez homogène sur la base de mesures faites fruit par fruit, ceci en déterminant la moyenne et la variabilité de la cueillette par son écart-type.

Définition de la maturité optimale (Mo)

Nous avons admis dans nos expérimentations que le stade de maturité optimale pouvait être repéré par l'apparition d'une zone de déhiscence sur l'attache pédonculaire. La base du pédoncule prend une teinte jaune plus accentuée et de légères craquelures apparaissent. Ces signes sont nettement observés à la récolte pour les fruits mûrs des deux cultivars étudiés et dans les conditions de cultures rapportées. Toutefois d'autres résultats analytiques ont montré que cet indice de maturité se situe légèrement après le maximum d'accumulation de matières sèches solubles ou de sucres dans la pulpe (DUMAS de VAULX, AUBERT, 1977).

Conditions d'étude de la maturation et de la conservation

Les prélèvements de fruits sur les deux plantations ont été exposés dans notre étude plus générale sur l'évolution des fruits dans les quelques jours qui précèdent la maturité complète (DUMAS de VAULX, AUBERT, 1977). Les critères de choix tiennent compte de la date de floraison de chaque individu et de la connaissance des délais moyens notés avant la maturité optimale (déhiscence du pédoncule). On prélève plusieurs lots de 6 melons immatures pour confronter, dans les mêmes conditions, la fermeté de chair correspondant aux modifications de texture notées au niveau de l'écorce, sur des fruits encore verts et fraîchement cueillis.

De plus, dans les deux essais S.V. et T.P., à chaque récolte prématurée, un autre lot de 6 fruits est conservé à la température ambiante du laboratoire (20 à 25 °C) pendant une durée identique au temps (théorique) prévu pour arriver au stade de maturité optimale atteint par le fruit resté sur la plante.

Dans l'expérimentation en serre d'automne, pour le cultivar « Doublon », l'évolution de dureté de l'écorce a été suivie sur 6 fruits *in situ* pendant trois jours avant la récolte à maturité optimale (déhiscence du pédoncule); ceci afin de vérifier l'absence de traumatisme après des mesures répétées sur les mêmes fruits. Puis, après récolte de tous les fruits mûrs sur la plantation, des lots de 6 fruits ont été analysés après 1, 2, 3, 4 et 5 jours de conservation à température ambiante (20 à 25 °C); ceci en vue de confronter les deux critères de fermeté étudiés, externe et interne, au cours du catabolisme normal de fruits cueillis mûrs.

Déterminations sur la texture du melon

a) *Mesures de fermeté sur la chair*

Elles sont effectuées au pénétromètre mis au point à la Station de Technologie d'Avignon, selon un protocole décrit dans notre précédente publication (DUMAS de VAULX, AUBERT, 1976).

Il faut noter qu'un embout de diamètre 5 mm a été utilisé pour les deux essais (S.V. et T.P.) avec des melons à l'état immature. Par contre, pour une meilleure précision des mesures, on utilise un embout de 8 mm sur les melons cueillis mûrs de l'expérimentation serre d'automne. Les mesures correspondantes ne sont donc pas directement confrontables.

b) *Mesures de fermeté sur l'écorce*

L'appareil de mesure expérimenté est un duromètre SHORE (type A, normes ASTM D 676 et D 2240, DIN 53505, commercialisé par PROLABO et plusieurs autres sociétés de matériel de laboratoire). Il est normalement destiné aux contrôles de caoutchouc, élastomères synthétiques, cuirs, etc.

Par simple application sur l'échantillon et lecture directe sur un cadran, l'appareil enregistre la profondeur d'enfoncement d'un pénétrateur tronconique normalisé. Il est gradué en degrés Shore de 0 à 100. Une cale de vérification de l'étalonnage permet de contrôler la fidélité du système.

On mesure ainsi une déformation, élastique ou non, d'une profondeur de 2,4 mm, en admettant qu'il n'y ait pas perforation par la pointe de 1,34 mm de diamètre dont l'enfoncement est limité par une embase plane de diamètre 16 mm. La valeur prise en compte est le maximum atteint par l'aiguille.

Dans notre application sur l'écorce du melon, on intercalle une feuille de polyéthylène souple de 0,10 mm d'épaisseur. Cette pellicule évite la perforation et la mesure ne laisse sur le fruit qu'une trace imperceptible pour un observateur non averti. L'écrasement résultant ne lèse qu'une zone sous épidermique très réduite et infime par rapport aux traumatismes subis en cours de culture et de commercialisation.

On effectue 10 mesures par fruit dans un plan « tropical », sur le sommet de chaque côte, sur une surface de préférence lisse. Dans nos essais préalables, on note que les valeurs trouvées sur la demi-sphère correspondant à la cicatrice pistillaire sont toujours légèrement inférieures à celles prises sur les zones plus proches du pédoncule et sont plus discriminantes.

Résultats

Tout d'abord, l'intérêt méthodologique et pratique du test proposé est vérifié en tenant compte de la variabilité des déterminations sur un même fruit et sur un lot de 6 fruits, par rapport à celles obtenues au pénétromètre. Cette confrontation préalable de la précision relative des deux mesures de texture est résumée dans le tableau 1 pour des melons cueillis mûrs ou immatures et conservés plusieurs jours à température ambiante entre 20 et 25 °C.

Ce travail est complémentaire d'une étude sur l'évolution de la qualité du melon au cours des derniers jours de la maturation (DUMAS de VAULX, AUBERT, 1977). La figure 1 réunit les déterminations faites sur la fermeté de la chair et la dureté de l'écorce pour les deux cultivars étudiés et pour deux façons culturales et différents stades de cueillette.

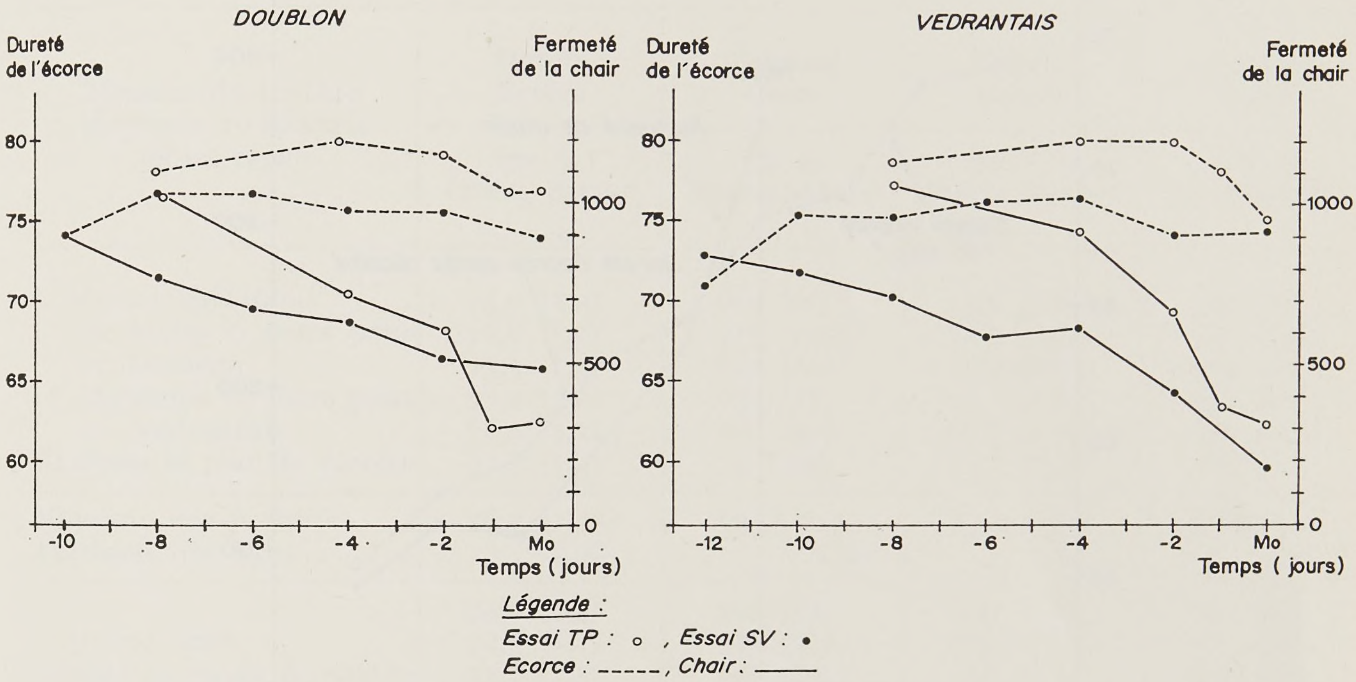


FIG. 1. — *Évolution de la texture des melons en fin de maturation sur deux cultivars et deux essais culturaux en serres.*

Mo : date de maturité optimale.
Dureté de l'écorce : degrés Shore.
Fermeté de la chair : force en g donnée par le pénétromètre avec embout de 5 mm.

Dans le tableau 2, l'évolution des mêmes indices de texture a été considérée sur les lots de fruits conservés à température ambiante, que l'on a laissé mûrir détachés de la plante jusqu'au stade théorique de maturité optimale (Mo).

La figure 2 montre, sur l'expérimentation d'automne en serre verre, l'évolution de la texture des fruits cueillis mûrs et conservés à température ambiante. La dureté de l'écorce commence à diminuer *in situ* avant le stade de maturité optimale (Mo). Après récolte, la fermeté de la chair chute rapidement et atteint en moins de quatre jours la limite admissible de commercialisation, située entre 100 et 150 g pour les mesures au pénétromètre (avec un embout de diamètre 8 mm); ceci conformément aux résultats obtenus l'année précédente (DUMAS de VAULX, AUBERT, 1976).

Discussion

1. — *Remarques sur la méthodologie des mesures de texture*

LE pénétromètre utilisé enregistre globalement des forces de compression et de cisaillement s'opposant à l'avancement d'un embout cylindrique dans la pulpe, au milieu du mésocarpe. La résistance des parois cellulaires et des fibres cellulosiques joue un rôle aussi important que les teneurs en composés pectiques

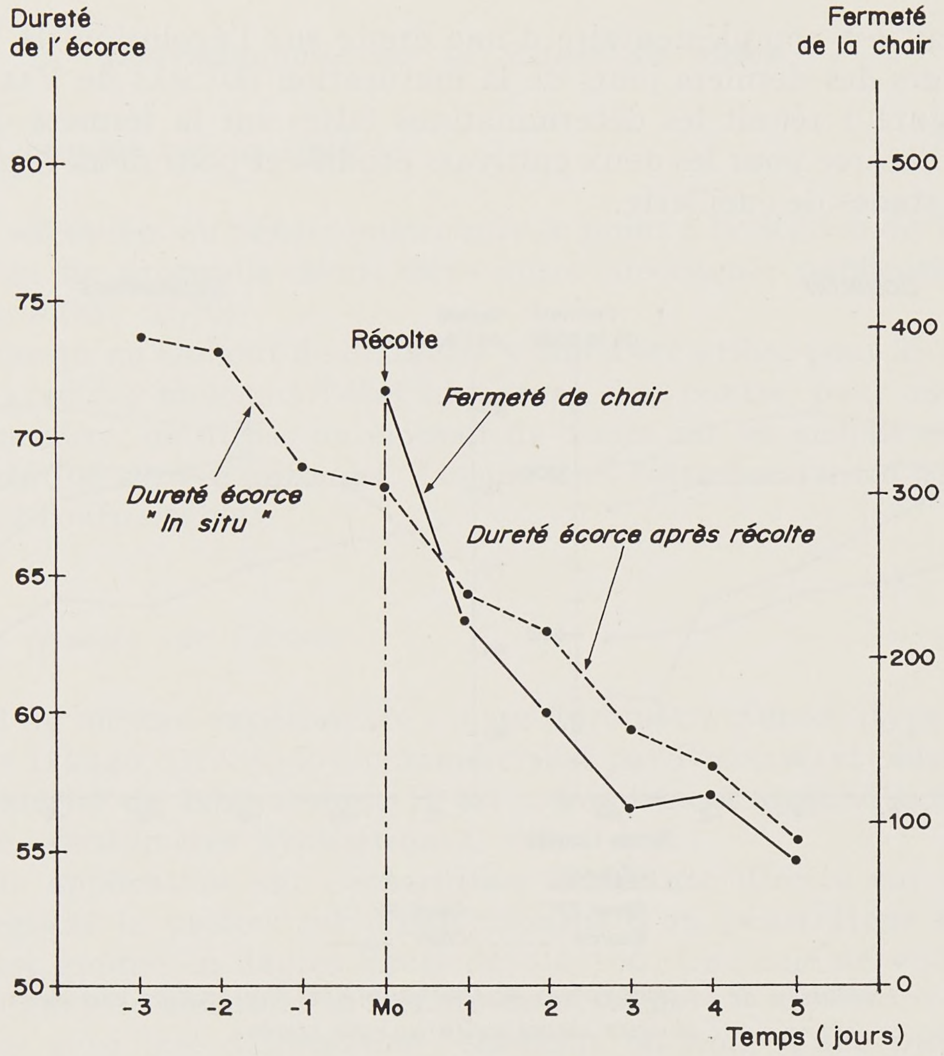


FIG. 2. — *Évolution de la texture de melons du type* Cantaloup charentais cv. Doublon, *avant récolte dans un essai en serre-verre en culture automnale, puis pendant la conservation à température ambiante* (*25 °C*).

Mo : date de maturité optimale.
Dureté de l'écorce : degrés Shore.
Fermeté de la chair : force en g donnée par le pénétromètre avec embout de 8 mm.

dans la fermeté de la chair (DUMAS de VAULX, AUBERT, 1976; YAMAGUCHI et al., 1977).

Le Duromètre expérimenté ne mesure qu'une déformation plus ou moins élastique des tissus de l'épiderme, accompagné de l'écrasement de quelques couches de cellules sous-jacentes. Cette lésion très localisée sera fonction de la structure et de l'état de turgescence de l'écorce du melon. Cet indice est donc différent du précédent et traduit moins bien la qualité gustative de fermeté de chair. Par contre, il renseigne mieux sur l'aptitude du melon à supporter des chocs mécaniques et des traumatismes superficiels pendant les manipulations au champ ou en cours de commercialisation.

Sur un plan théorique, la rhéologie différente des deux types de mesures est difficile à préciser (KRAMER et SZCZESNIAK, 1973; PELEC, GOMEZ-BRITO et MALEVSKI 1976; REEVE, 1970; YAMAGUCHI et al., 1977). Mais on peut penser qu'il y a des liaisons communes au niveau de la viscoélasticité des cellules d'un melon, de la cohésion des membranes et des pressions hydrostatiques qui s'exercent (turgescence) quelles que soient les couches de tissus du mésocarpe concernées pour un même fruit.

Les liens entre les deux techniques ne peuvent apparaître que sur un nombre

TABLEAU 1

Variabilité des mesures de texture sur le melon
(10 mesures par fruit) et sur une cueillette de 6 fruits
(écart-type des moyennes)

Essais en serre verre	cv. Doublon*		cv. Vedrantais**	
Mesures de texture Moyenne / 10 mesures (écart-type)	Dureté Écorce	Fermeté Chair	Dureté Écorce	Fermeté Chair
	(en %) Indice SHORE	(en g) Pénétromètre	(en %) Indice SHORE	(en g) Pénétromètre
Melons immatures : Mo moins 6 jours pour cv. Doublon * Mo moins 10 jours pour cv. Vedrantais Analysés le jour de récolte	75,0 (1,2)	667 (61)	74,6 (1,8)	767 (89)
	76,8 (1,1)	717 (102)	75,7 (1,3)	772 (95)
	75,3 (1,3)	699 (82)	75,0 (1,8)	922 (90)
	77,2 (1,6)	635 (87)	73,8 (1,6)	850 (66)
	78,2 (1,1)	613 (39)	76,5 (1,1)	655 (122)
	77,4 (1,4)	712 (95)	75,5 (0,9)	778 (89)
Moyenne des 6 fruits	76,7 (1,25)	673,8 (43)	75,2 (0,94)	790,7 (90)
Précision (en %)	3,98	15,6	3,06	27,8
Melons mûrs : Cueillis au stade de maturité optimale (Mo) Analysés le jour de récolte	74,0 (1,5)	493 (63)	74,1 (1,3)	102 (41)
	72,5 (1,1)	332 (39)	76,4 (1,6)	181 (21)
	73,2 (1,5)	645 (171)	75,1 (2,4)	190 (23)
	75,1 (1,4)	685 (109)	73,1 (1,6)	179 (28)
	73,8 (0,9)	247 (52)	73,6 (1,2)	194 (36)
	75,0 (1,7)	503 (132)	73,9 (1,3)	216 (37)
Moyenne des 6 fruits	73,9 (1,01)	483,8 (170)	74,4 (1,2)	176,6 (38,8)
Précision (en %)	3,34	86,5	3,95	53,7
Melons conservés : A température ambiante (20-25 °C) cueillis immatures * Mo moins 6 jours pour cv. Doublon ** Mo moins 10 jours pour cv. Vedrantais Stockage jusqu'à Mo théorique	65,4 (1,3)	115 (41)	54,6 (2,5)	94 (17)
	63,6 (1,2)	3 (—)	52,1 (1,7)	80 (12)
	70,9 (1,7)	45 (27)	54,5 (2,1)	82 (14)
	73,1 (1,5)	112 (24)	54,9 (2,1)	66 (13)
	68,9 (1,0)	214 (57)	54,7 (2,0)	54 (15)
	66,3 (0,9)	48 (22)	56,1 (1,7)	55 (10)
Moyenne des 6 fruits	68,0 (3,6)	89,4 (74,4)	54,5 (1,3)	71,7 (16,1)
Précision (en %)	13	203,6	5,8	55

Variabilité des mesures de texture sur le melon (10 mesures par fruit) et sur une cueillette de 6 fruits (écart-type des moyennes). La précision relative des deux indices de texture est donnée sur chaque récolte pour les 3 stades de maturité distincts et pour les deux cultivars.

En statistique, cette précision est déterminée à l'aide des écarts-types sur les moyennes de 6 fruits, avec un t de Fischer de 2,447 pour un niveau de probabilité de $P = 0{,}05$.

important de déterminations pour prévenir les variations sectorielles de texture que l'on peut observer sur le melon, plus particulièrement selon sa position sur la plante et le sol. Le nombre de dix mesures par fruit correspond généralement aux côtes d'un melon du type *Cantaloup charentais*. La variabilité des mesures sur un même fruit traduit l'homogénéité de texture.

On note une fluctuation plus grande des écarts-types sur la fermeté de la chair que sur la dureté de l'écorce, d'autant plus que les melons sont mûrs (tabl. 1). Toutefois, les écarts-types entre les moyennes des 6 individus d'un même lot sont du même ordre de grandeur que ceux sur un même fruit; ceci tendrait à prouver que les lots sont constitués de melons à des stades physiologiques voisins (nos repères théoriques de maturité sont donc satisfaisants).

La précision relative des mesures sur une moyenne est une notion statistique à considérer avec réserves dans cette confrontation, mais elle a l'avantage de mettre en relief l'intérêt respectif des deux indices de texture. Les mesures au pénétromètre donnent un étalement des valeurs plus grand et révèlent des différences significatives entre les lots aux stades mûrs et immatures. Néanmoins, le caractère très aléatoire de ces déterminations, sur les fruits mûrs ou conservés à la température ambiante, donne une précision insuffisante au pénétromètre avec l'embout utilisé. On note ainsi que les mesures au pénétromètre situent au même niveau l'effondrement de la chair des deux lots de melons conservés.

Par contre, on observe un certain recouvrement des valeurs pour les mesures de dureté de l'écorce des lots de melons immatures. Toutefois, pour des fruits mûrs ou ramollis intérieurement, le duromètre SHORE est plus discriminant et travaille dans une gamme de résistances plus favorable sans adaptation particulière du détecteur.

Sur l'ensemble des melons pris à des stades de maturité ou de conservation très différents, les deux techniques sont bien complémentaires. Le duromètre se révèle un appareil surtout valable pour des fruits proches de la maturité optimale ou dégradés. Son utilisation est assez facile et rapide à mettre en œuvre. Nous avons constaté que l'influence du manipulateur est faible, entre deux laboratoires, compte tenu de la forte variabilité individuelle des melons d'un même lot. La reproductibilité des mesures apparaît satisfaisante.

Le test proposé offre un large éventail de possibilités expérimentales, éventuellement sur d'autres fruits et légumes.

2. — *Évolution de la texture du melon avant maturité*

Les deux indices confrontés n'évoluent pas de la même façon durant toute la période de maturation considérée (fig. 1).

La fermeté de chair décroît régulièrement de façon significative; le ramollissement interne s'accélèrant 3 à 4 jours avant la maturité optimale.

La dureté de l'écorce passe par un plateau situé entre 8 et 2 jours avant la maturité optimale, selon nos deux expérimentations en serres et pour les 2 cultivars. Le test statistique du « t de student » appliqué aux valeurs de l'indice SHORE montre bien que les lots à 12 jours (cv. « védrantais ») et à 10 jours (cv. « Doublon ») de l'essai en serre verre hivernale, sont significativement (niveau P = 0,05) moins fermes que les lots cueillis 8 jours à 2 jours avant maturité. Toutefois, entre ces limites approximatives, les écarts non significatifs ne permettent pas de préciser la date du maximum de dureté de l'écorce; de même, la position d'un sommet apparaît mal dans les mesures effectuées sur les melons de l'essai en tunnel plastique.

Cependant, on observe un certain parallélisme entre la chute de fermeté interne et celle de dureté de l'écorce dans les 3 à 4 jours qui précèdent la maturité optimale (Mo). La baisse est peu marquée pour les deux indices dans l'essai S.V.; elle est plus sensible dans l'essai T.P. Les deux cultivars se comportent de la même façon (le cv. « Doublon » apparaît un peu plus ferme et se dégrade légèrement moins

vite). Il existe donc une corrélation étroite entre les deux indices de texture, dès que les melons atteignent un stade suffisant de maturité.

Pratiquement, l'indice SHORE semble difficilement exploitable comme critère sûr de sélection et de cueillette, car on reste dans des gammes de valeurs trop étroites, compte tenu de la variabilité entre fruits et selon les essais.

3. — *Évolution de la texture du melon en cours de conservation*

La dégradation de fermeté du melon peut être différente selon le stade physiologique de récolte.

a) *Fruits cueillis mûrs* (fig. 2)

On observe une baisse régulière des deux indices de texture, qui prolonge l'évolution déjà amorcée avant le stade de maturité optimale (Mo). La corrélation entre les deux types de mesures est évidente.

L'utilisation d'un embout plus large sur le pénétromètre a permis de relever arbitrairement les niveaux de fermeté de la chair, mais ces mesures ne sont pas directement confrontables avec celles de la figure 1, quoique proches pour le stade de maturité optimale (Mo); ceci est un inconvénient fondamental que n'a pas le duromètre utilisé. L'indice SHORE évolue presque linéairement dans cette expérimentation et sur une période de 8 jours.

La dureté de l'écorce, mesurée objectivement et sans traumatisme sensible du melon, permet de suivre le catabolisme interne d'un fruit mûr. Les évolutions individuelles seraient à préciser, mais l'échantillonnage considéré (6 melons par contrôle) suffit à mettre en évidence des différences sensibles de texture, généralement significatives, pour suivre jour après jour la dégradation d'une récolte conservée à température ambiante.

Les limites admissibles de ramollissement de la chair pour la consommation ont été proposées précédemment dans les résultats. De même, dans cet essai (fig. 2), un niveau de dureté de l'écorce supérieure à 60 en indice SHORE, apparaît nécessaire pour que les fruits ne soient pas trop ramollis intérieurement.

b) *Fruits cueillis immatures* (tabl. 2)

L'essai de conservation à température ambiante (20 à 25 °C) de melons cueillis précocement nous confirme les inconvénients d'une telle pratique sur la fermeté des fruits, sans espoir d'une meilleure tenue des fruits en cours de commercialisation. Par ailleurs, les autres critères de qualité n'ont rien à gagner d'une récolte prématurée (DUMAS de VAULX, AUBERT, 1977).

Quels que soient le stade de cueillette et la fermeté initiale (fig. 1), le ramollissement de la chair devient excessif, alors que la dureté de l'écorce diminue un peu moins sensiblement (tabl. 2).

Ainsi, pour traduire un état de conservation des melons, l'indice au duromètre SHORE semble plus discriminant que les mesures au pénétromètre qui sont alors dans une gamme de valeurs très faibles et imprécises pour une chair très ramollie. Une fermeté de la chair inférieure à 100 g, mesurée au pénétromètre avec un embout

TABLEAU 2

Conservation de melons cueillis avant maturité optimale

Analyses de texture après mûrissement à température ambiante (20 à 25 °C)

	Stade de récolte et conservation	cv. Doublon		cv. Vedrantais	
	Analyses effectuées le jour où les melons auraient dû être mûrs s'ils étaient restés sur la plante	Dureté de l'écorce (en %) Indice SHORE	Fermeté de la chair (en g) Pénétromètre	Dureté de l'écorce (en %) Indice SHORE	Fermeté de la chair (en g) Pénétromètre
Essais en serre verre	Moins 10 jours	63,7 (2,9)	147,4 (57,5)	60,3 (6,5)	249,7 (221,5)
	Moins 8 jours	62,3 (2,8)	73,4 (53,7)	54,3 (1,3)	71,7 (16,1)
	Moins 6 jours	68,0 (3,6)	89,4 (74,4)	64,4 (1,2)	38,9 (40,5)
	Moins 4 jours	66,7 (2,9)	42,0 (70)	64,2 (4,9)	39,5 (42,2)
	Moins 2 jours	69,3 (2,9)	97,8 (23,1)	71,0 (3,0)	148,5 (77,8)
	Maturité optimale (Mo)	73,9 (1,0)	483,8 (171)	74,4 (1,2)	176,6 (38,8)
Essais en tunnel plastique	Moins 4 jours	69,6 (1,5)	90,7 (49,2)	68,1 (3,0)	86,5 (23,8)
	Moins 2 jours	—	—	72,6 (1,7)	149,5 (38,0)
	Maturité optimale (Mo)	76,8 (4,9)	311 (181,1)	75,0 (3,3)	310,6 (163,3)

Moyennes et écarts-types pour 6 melons par essai.

de diamètre 5 mm, est une valeur insuffisante pour une texture acceptable au niveau de la commercialisation et du consommateur.

Une dureté d'écorce moyenne inférieure à 68, en indice SHORE, peut traduire, sur un lot de melons de nos essais, une durée de conservation excessive à température ambiante, pendant plusieurs jours; en effet, toutes les mesures effectuées en frais sur les différentes cueillettes sont toujours supérieures à ce niveau minimum pour tous les lots prélevés moins de 10 jours avant la maturité optimale sur la plante (fig. 1 et 2).

De plus, les chutes relatives de fermeté par rapport aux mesures en frais apparaissent même supérieures à celles notées dans la conservation des fruits mûrs. Entre 8 jours et 2 jours de conservation à température ambiante, selon la précocité de la cueillette et pour arriver, théoriquement, au même stade optimal de maturité (Mo), tous les melons cueillis immatures se retrouvent au même niveau de ramollissement (tabl. 2).

Ainsi, les melons cueillis 4 jours avant la date de maturité optimale (Mo) se dégraderont en moins de 4 jours à température ambiante; de même, ceux pris entre 6 à 8 jours avant maturité seront trop mous après une semaine de conservation et, de plus, gustativement très médiocres sur le plan de la saveur sucrée.

En définitive, pour les deux cultivars de *Cantaloup charentais* étudiés et dans les conditions de cultures précisées, la durée de conservation possible à température ambiante sera inférieure à l'avance prise par une cueillette précoce.

Conclusion

Le test de fermeté non destructif expérimenté s'avère représentatif des dégradations internes de la chair du melon *Cantaloup charentais*, cv. « Doublon » et cv. « Védrantais », dans les conditions des essais rapportés.

Cet indice de texture traduit moins bien que la mesure directe au pénétromètre l'impression gustative de fermeté de chair. Toutefois, cette technique est plus discriminante et plus simple à mettre en œuvre, sans adaptation, pour des fruits mûrs ayant atteint un niveau sensible de ramollissement. De plus, la résistance épidermique du melon est en soi un facteur de la qualité technologique et commerciale.

La dureté de l'écorce nous renseigne sur l'évolution plus ou moins rapide du melon en cours de conservation à température ambiante. Cet indice peut éventuellement servir à éliminer des fruits trop mûrs et à chair molle, ou ayant perdu leur texture initiale.

Sur un autre plan pratique, ces essais confirment l'inconvénient de récolter des melons insuffisamment mûrs pour améliorer leur tenue en cours de conservation. Les fruits cueillis trop précocement, puis maintenus à température ambiante, se ramollissent excessivement en moins de jours que l'avance prise sur la date de maturité optimale sur la plante. Nous avons montré par ailleurs (DUMAS de VAULX, AUBERT, 1977) que les cueillettes trop hatives nuisent aux autres facteurs de la qualité; en particulier, les sucres s'accumulent dans les tous derniers jours qui précèdent la maturité.

D'une façon générale, quel que soit le stade de cueillette et pour les cultures décrites, les melons du type *Charentais* ont une texture de chair délicate peu adaptée à des conditions de commercialisation difficiles; l'amélioration des modes de

transport et d'entreposage est une nécessité pour garantir cette qualité pendant plusieurs jours. De nouveaux cultivars plus fermes sont aussi envisagés par la voie génétique. Le test comparatif proposé devrait aider dans ces recherches.

Recu pour publication en juillet 1977.

Summary

Undestructive firmness test for the maturity control of melons

This experimentation deals with two cultivars of the « Charentais » type (cv. « Doublon » and cv. « Vedrantais ») coming from two different green-house crops.

The firmness of the melon peel is mesured by the help of a SHORE device avoiding the perforation of the epiderm. This rating shows clearly the internal modifications of the flesh firmness on fruits approaching optimal ripeness and during conservation. It corresponds with the mesures carried out by a penetrometer directly on a section.

The incidence of premature picking on the texture quality is mentioned concerning melons stocked under ambient conditions (20-25 °C).

Key-words: *Melon, quality, ripening, texture, firmness, conservation.*

Références bibliographiques

DUMAS de VAULX R., AUBERT S., 1976. Caractères biochimiques, qualité et aptitude à la conservation de melons (*Cantaloup charentais, cv. Doublon*) cultivés sous serres. *Ann. Techn. agric.*, **25** (4) 309-336.

DUMAS de VAULX R., AUBERT S., 1977. Évolution comparée des fruits de deux cultivars de melon « Doublon » et « Védrantais » type « *charentais* » au cours des derniers jours de la maturation. *Ann. Techn. agric.*, **27** (3), 13-27.

KRAMER A., SZCZESNIAK A. S., 1973. Texture measurements of food, chap. 4, 5 et 6, p. 33 à 108. Ed. D. Reidel publishing company, Dordrecht, Holland.

MONET R., BASTARD Y., CAMPOY P., 1974. Étude de la variation de la dureté du fruit *in situ* chez le pêcher. *Ann. Technol. agric.*, **23** (1), 39-50.

PELEG M., GOMEZ BRITO M., MALEVSKI Y., 1976. Compressive failure patterns of some juicy fruit. *J. Food Sci.*, **41** (6), 1320-1324.

REEVE R. M., 1970. Relationships of histological structure to texture of fresh and processed fruit and vegetables. *J. of Texture studies*, **1**, 274-284.

YAMAGUCHI M., HUGUES D. L., YABUMOTO K., JENNINGS W. G., *Scientia Horticulturae*, **6** (1), 59-70.

Ann. Technol. agric., 1977, **27** (3), 255-273.

Flore malolactique de moûts et de vins du Canton du Valais (Suisse)

I. — Lactobacilles et pédiocoques

R. MARET et T. SOZZI

Département de Développement Technologique
Société d'Assistance Technique pour Produits Nestlé S.A., Lausanne

Résumé

Nous avons étudié la flore malolactique de moûts et de vins du canton du Valais (Suisse) à divers stades de fermentation.

Les souches de lactobacilles et de pédiocoques qui ont été isolées peuvent être séparées en quatre groupes :

— groupe a : *Lactobacillus casei* (homofermentaires).
— groupe b : *Lactobacillus plantarum* (homofermentaires).
— groupe c : *Lactobacillus brevis* (hétérofermentaires).
— groupe d : *Pediococcus cerevisiae* et *pentosaceus* (homofermentaires).

Les lactobacilles homofermentaires, présents avant la fermentation malolactique, semblent avoir disparu au moment où celle-ci se déclenche.

Une fois la fermentation alcoolique terminée, prédominent essentiellement les pédiocoques et les lactobacilles hétérofermentaires. Des leuconostocs ont également été trouvés dans le matériel examiné. Leur étude fera l'objet d'une publication ultérieure.

La caractérisation des souches a été grandement facilitée par l'emploi des tests « API50 *Lactobacillus* System », de Vixotab (France).

Mots clés : *Moûts, vins, flore malolactique.*

Introduction

L'omniprésence dans toutes les zones viticoles du monde de populations bactériennes capables d'induire — au cours de la vinification — les processus de la fermentation malolactique n'est plus à démontrer (CARR, 1957; LAMBION et MESKHI, 1957; RADLER, 1958; INGRAHAM *et al.*, 1960; POITTEVIN *et al.*, 1963; DU PLESSIS et VAN ZYL, 1963; YOCHIZUMI, 1963; FORNACHON, 1964; BARRE, 1966; PEYNAUD et DOMERQ, 1967; WEILER et RADLER, 1970). Malgré de nombreuses études, la

fermentation malolactique est encore un processus que l'on parvient difficilement à maîtriser. Pourtant, RADLER, 1957, LUTHI, 1958, CARR, 1958, PEYNAUD, 1967, entre autres, ont déjà songé à résoudre les problèmes d'un contrôle rationnel de cette fermentation. A l'heure où l'on souhaiterait parvenir à une stabilisation purement biologique des vins, c'est-à-dire à une suppression de la pratique du sulfitage, ces études prennent naturellement un sens nouveau.

Dans ce travail, nous présentons les résultats d'une étude portant sur des micro-organismes isolés de moûts et de vins du canton du Valais /Suisse, capables d'opérer la désacidification biologique i.e la transformation de l'acide malique en acide lactique. Dans ces zones viticoles plutôt septentrionales, où l'acidité des moûts est en général passablement élevée, la fermentation malolactique est une nécessité œnologique impérieuse, sans compter qu'elle représente le plus sûr moyen d'assurer la stabilité biologique des vins.

Partie expérimentale

Technique d'isolement

Les échantillons de moûts et de vins étaient inoculés dans les milieux liquides suivants :

a) *Milieu de* BARRE (1966) *modifié comme suit :*

Yeast extract Difco	6 g	
Bactotryptone Difco	2 g	
Jus de raisin	60 ml	
Acide DL-malique	10 g	pH 4,2
Glucose	15 g	
Traces de Mg, Mn, Fe, Ca		
Eau	1 000 ml	

b) *Milieu de* DE MAN, ROGOSA *et* SHARPE *liquide (1960) ou MRS liquide (pH 4,5) (Difco).*

c) *Milieu de* WEILLER *et* RADLER *(1970) (pH 4,3)*

Après enrichissement sur les milieux liquides et dilutions successives par du Ringer stérile, les microorganismes étaient ensemencés dans la masse en milieu de Weiller gélosé, auquel on avait ajouté 20 mg /l d'actidione pour réduire la prolifération des levures. Les boîtes de Pétri ainsi préparées étaient incubées 5 jours à 30 °C. Dans chaque boîte, les colonies morphologiquement différentes étaient repiquées en milieu liquide. Après observations microscopiques, on éliminait le maximum de souches morphologiquement identiques. Les souches ainsi sélectionnées étaient ensuite conservées lyophilisées.

Tests d'identification

Expérience faite, nous nous sommes rendu compte que le milieu MRS à pH 4,5 convenait relativement bien à la culture de l'ensemble des souches lactiques isolées des moûts et des vins. Nous avons donc effectué les tests d'identification sur la base de ce milieu uniquement.

Production de CO_2 à partir de glucose

Milieu : MRS sans citrate d'ammonium à pH 4,5, contenant 3 p. 100 de glucose. Les tubes inoculés étaient recouverts d'une hauteur de 1 cm d'un mélange 1/1 stérile, d'huile de vaseline et de paraffine. Toute production de CO_2 entraînait un déplacement vers le haut du bouchon paraffiné.

pH minimum, optimum et maximum de croissance

Milieu : MRS dont le pH était ajusté après stérilisation par de l'acide malique ou du NaOH stérile aux valeurs suivantes : 3-3,5-4-4,5-5-5,5-6-6,5-7-7,5-8. Le degré de croissance était estimé turbidimétriquement.

Croissance en aérobiose et anaérobiose

Aérobiose : MRS (pH 4,5) liquide en Erlens agités.
Anaérobiose : MRS liquide (pH 4,5) en tubes incubés sous CO_2.

Température de croissance

Milieu : MRS à pH 4,5.
La croissance a été observée à 3 températures : 10 °C, 30 °C et 45 °C.

Présence de catalase

Une goutte de culture fraîche en MRS (pH 4,5) était mélangée à une goutte d'eau oxygénée. Une effervescence démontrait la présence de catalase (dégagement de O_2).

Production d'acétoïne à partir de glucose

Milieu : MRS sans citrate d'ammonium à pH 4,5.
La présence d'acétoïne était mise en évidence par la réaction de Voges-Proskauer après 1 j et 8 j d'incubation.

Production de NH_3 à partir d'arginine

Milieu : MRS à pH 4,5 ne contenant que 0,5 p. 100 de glucose et 0,3 p. 100 d'arginine.

Test : Après 1 et 7 j d'incubation, quelques gouttes de réactif de Nessler étaient ajoutées à 1 ml de culture.

L'apparition d'un précipité brun rouille témoignait d'une réaction positive.

Hydrolyse de l'esculine

Milieu : MRS esculine agar de la Biolife (pH 4,5).

Test : 1 ml de culture active était mélangée à 10 ml de milieu en boîte de Pétri. Une réaction positive se traduisait par un noircissement du milieu.

Résistance à l'alcool

Milieu : MRS à pH 4,5.

Au milieu stérile étaient ajoutés 5, 10, 15 p. 100 d'alcool absolu stérilisé sur bougie. Après inoculation, les tubes étaient mis à incuber à la température optimale de la souche considérée.

Résistance au sel

Milieu : MRS à pH 4,5 contenant 2,4 et 6,5 p. 100 de NaCl.

L'incubation durait 7 j.

Configuration de l'acide lactique produit

Milieu : MRS à pH 4,5.

La détermination en était effectuée selon la méthode MATTSON (1965).

Fermentation des sucres

Milieu : MRS à pH 4,5.

Après incubation, les cellules étaient séparées par centrifugation et lavées dans du Ringer stérile où elles étaient finalement mises en suspension. Avec cette suspension, on inoculait le milieu spécial pour fermentation (MRS fermentation medium de la Biolife) contenant les divers sucres.

Les sucres testés furent le raffinose, le lactose, le maltose, le saccharose, le fructose, le glucose, l'arabinose et le xylose. La fermentation du glycérol fut également examinée.

Fermentation de l'acide malique

La transformation de l'acide malique en acide lactique était suivie à partir du milieu de base (MRS ajusté à pH 4,5 par l'acide malique) par chromatographie sur couche mince de cellulose.

On a utilisé les plaques Merck prêtes à l'emploi.

Les échantillons étaient décationisés dans une petite éprouvette au contact des résines échangeuses de cations avant d'être portés sur la chromatographie.

Éluant : Butanol-acide formique-eau, 100/20/9, V/V/V.

Lorsque l'éluant avait migré jusqu'à 4 cm environ de leur bord, les plaques étaient séchées à l'air chaud puis révélées à l'aide d'une solution de bleu de bromo-

phénol (0,04 p. 100 dans de l'alcool à 95 p. 100, le pH ayant été fixé à 6,5 par de la soude). La réaction positive se traduisait par la disparition de la tache correspondant à l'acide malique et l'apparition concomitante de celle de l'acide lactique.

API tests

Nous avons également utilisé pour l'identification d'une partie des microorganismes les galeries API (Vixotab - La Balme-les-Grottes - France) développées pour la classification des lactobacilles. Nous avons modifié la spécification des caractères notés de 40 à 49 par rapport à ceux normalement testés sur les galeries (voir tabl. 1). Nous avons donc examiné séparément en tubes essais les caractères 42, 43 et 49.

Les suspensions bactériennes utilisées pour les tests API avaient été préparées en MRS. Après développement optimal, la biomasse était séparée par centrifugation et reprise dans le même milieu sans sucres, lavée 1 fois, puis utilisée en suspension de DO de 0,7 à 1,0 à 540 nm (cuvette de 1 cm) pour la préparation des galeries d'identification (MARET, 1976).

TABLEAU 1

Caractères biochimiques selon API test, avec notations différentes de 40 à 49

0 0		1 0	Galactose	2 0	Méthyl-d-mannoside
1	Glycérol	1	*d* (+) glucose	1	Méthyl-d-glucoside
2	Erythritol	2	*d* (—) lévulose	2	N-acétyl-glucosamine
3	*d* (—) arabinose	3	*d* (+) mannose	3	Amygdaline
4	*l* (+) arabinose	4	*l* (—) sorbose	4	Arbutine
5	Ribose	5	Rhamnose	5	Esculine (réduction)
6	*d* (+) xylose	6	Dulcitol	6	Salicine
7	*l* (—) xylose	7	Méso-inositol	7	*d* (+) cellobiose
8	Adonitol	8	Mannitol	8	Maltose
9	Méthyl-xyloside	9	Sorbitol	9	Lactose
3 0	*d* (+) mélibiose	4 0	Arginine dihydrolase		
1	Saccharose	1	Croissance et production de gaz à partir de glucose		
2	*d* (+) tréhalose	2	Fermentation des citrates		
3	Inuline	3	Formation de dextrane à partir de saccharose		
4	*d* (+) mélézitose	4	Teepol 0,4 %		
5	*d* (+) raffinose	5	NaCl 4 %	croissance en présence de	
6	Dextrine	6	NaCl 6 %		
7	Amylose	7	ONPG (β galactosidase)		
8	Amidon	8	Réduction des nitrates		
9	Glycogène	9	Voges-Proskauer (diacétyle + acétoïne à partir de citrates)		

Résultats et discussion

Les isolements

Après un tri sévère, 32 souches capables de transformer l'acide malique en acide lactique avaient été retenues pour examen. Leur répartition dans les échantillons a été présentée dans les tableaux suivants. L'ensemble des souches est de type Gram+ et Catalase (—).

TABLEAU 2

Souches isolées de moûts fraîchement pressés

Appellation	Date et lieu de prélèvement	Milieu d'isolement	Code	Morphologie
Fendant 1 (1)	4-11-72 Fully	Barre	Vi4, Vi24	Bacilles
		MRS	Vi1, Vi2, Vi25	Bacilles
		Weiller	Vi3, Vi33, Vi34	Bacilles
Fendant 2	4-11-72 Fully	MRS	Vi5	Bacilles
Fendant 3	4-11-72 Fully	MRS	Vi36, Vi37, Vi38	Bacilles
		Weiller	Vi35	Bacilles
Fendant 4	25-10-73 Fully	MRS	Vi149, Vi147	Bacilles

(1) Chasselas.

TABLEAU 3

Souches isolées de moûts en fermentation alcoolique

Appellation	Date et lieu de prélèvement	Milieu d'isolement	Code	Morphologie
Johannisberg 1 (1)	4-11-72 Fully	Barre	Vi23	Bacilles
		MRS	Vi8	Bacilles
		Weiller	Vi27	Bacilles
Arvine	4-11-72 Fully	Barre	Vi10	Bacilles

(1) Vin obtenu à partir de Sylvaner.

TABLEAU 4

Souches isolées de vins en fermentation malolactique

Appellation	Date et lieu de prélèvement	Milieu d'isolement	Code	Morphologie
Riesling-Sylvaner	12-2-73 Fully	WEILLER	Vi40	Coques
Fendant 5	16-2-73 Chamoson	WEILLER	Vi47	Bacilles
Dôle 1 (1)	12-2-73 Chamoson	WEILLER	Vi41	Bacilles
			Vi43	Coques
Dôle 2	16-2-73 Chamoson	WEILLER	Vi48	Bacilles
			Vi49	Coques
Point noir 2	16-2-73 Chamoson	WEILLER	Vi50	Coques

(1) Mélange de Pinot noir et Gamay supérieur.

TABLEAU 5

Souches isolées de vins ayant achevé leur fermentation malolactique

Appellation	Date et lieu de prélèvement	Milieu d'isolement	Code	Morphologie
Johannisberg 2	16-2-73 Chamoson	WEILLER	Vi45	Coques
Johannisberg 3	17-3-73 Chamoson	WEILLER	Vi55, Vi56	Bacilles
Malvoisie (1)	17-3-73 Chamoson	WEILLER	Vi52	Bacilles
Muscat	7-4-73 Fully	WEILLER	Vi59	Coques
Œil-de-Perdrix (1)	7-4-73 Fully	WEILLER	Vi61	Coques

(1) Vin obtenu à partir de Pinot gris.
(2) Pinot noir directement pressé sans cuvage.

TABLEAU 6

Caractères biochimiques des ferments malolactiques isolés des moûts

Caractères / Type	*L. casei*	*L. plantarum*	*L. brevis*
Nombre de souches	2	11	2
Production de CO_2	0/2 [1]	0/11	2/2
Catalase	0/2	0/11	0/2
Croissance :			
en aérobiose	2/2	11/11	2/2
en anaérobiose	2/2	11/11	2/2
à 10 °C	1/2	3/11	1/2
à 30 °C	2/2	11/11	2/2
à 45 °C	0/2	0/11	0/2
à pH 3,5	0/2	5/11	0/2
à pH 4	2/2	11/11	2/2
à pH > 4 et pH < 8	2/2	11/11	2/2
en présence d'alcool à 5 %	2/2	4/11	0/2
en présence de NaCl :			
à 2 %	2/2	11/11	1/2
à 4 %	2/2	11/11	1/2
à 6,5 %	2/2	11/11	0/2
sur jus de raisin	2/2	11/11	2/2
Fermentations sucrées :			
raffinose	0/2	8/11	0/2
lactose	2/2	11/11	2/2
maltose	2/2	11/11	2/2
saccharose	2/2	10/11	2/2
fructose	2/2	11/11	2/2
glucose	2/2	11/11	2/2
arabinose	0/2	9/11	2/2
xylose	0/2	9/11	2/2
glycérol	0/2	0/11	0/2
Autres fermentations :			
esculine	2/2	9/11	0/2
acide malique	2/2	11/11	2/2
— Production de NH_3, à partir d'arginine	0/2	0/11	2/2
— Acide L-lactique	2/2	0/11	0/2
— Acide D-L-lactique	0/2	11/11	2/2

[1] 0/2 = nombre de souches positives/nombre de souches totales.

Caractères biochimiques et morphologie de bactéries malolactiques isolées des différents échantillons

Souches isolées de moûts fraîchement pressés

Nous avons, dans cette série, classé comme *L. casei* (lactobacilles homofermentaires producteurs d'acide L-lactique à partir de glucose) 2 souches, à savoir : Vi33 et Vi34; comme *L. plantarum* (lactobacilles homofermentaires producteurs d'acide D et L-lactique) 11 souches, à savoir : Vi4, Vi24, Vi1, Vi2, Vi25, Vi3, Vi5, Vi36, Vi37, Vi38, Vi149; et enfin comme *L. brevis* (lactobacilles hétérofermentaires

producteurs d'acide D et L-lactique, capables de fermenter l'arabinose et le xylose) 2 souches, à savoir : Vi35 et Vi147.

Quelques caractères biochimiques généraux de ces microorganismes définis selon des méthodes classiques ont été présentés dans le tableau 6.

La majeure partie de la population microbienne de ces moûts était constituée de lactobacilles de type plantarum. Les lactobacilles de type casei et les hétérofermentaires de type brevis étaient en nombre plus restreint. De l'ensemble de ces moûts nous n'avons pu isoler aucune souche de pédiocoques.

Nombre de ces lactobacilles ne pouvaient pousser ou, dans certains cas, ne poussaient que très lentement en présence de haute teneur en alcool (de 10 à 15 p. 100)

Seuls 5 *L. plantarum* pouvaient se développer à pH 3,5 en MRS.

Les souches isolées de vins en fermentation alcoolique (tabl. 7, fig. 1 à 3, planche 1)

Dans ces vins la proportion de *L. plantarum* tendait à diminuer notablement. Les lactobacilles hétérofermentaires y étaient relativement plus fréquents. La souche de lactobacilles hétérofermentaires Vi8 a été classée comme *buchneri* en raison de sa capacité de fermenter le d (+) mélézitose (34+ sur API test). Cette souche *L. buchneri* Vi8 donne beaucoup plus d'acide lactique L (+) que de D (—) et est capable de dégrader le mannitol (18+ sur API test).

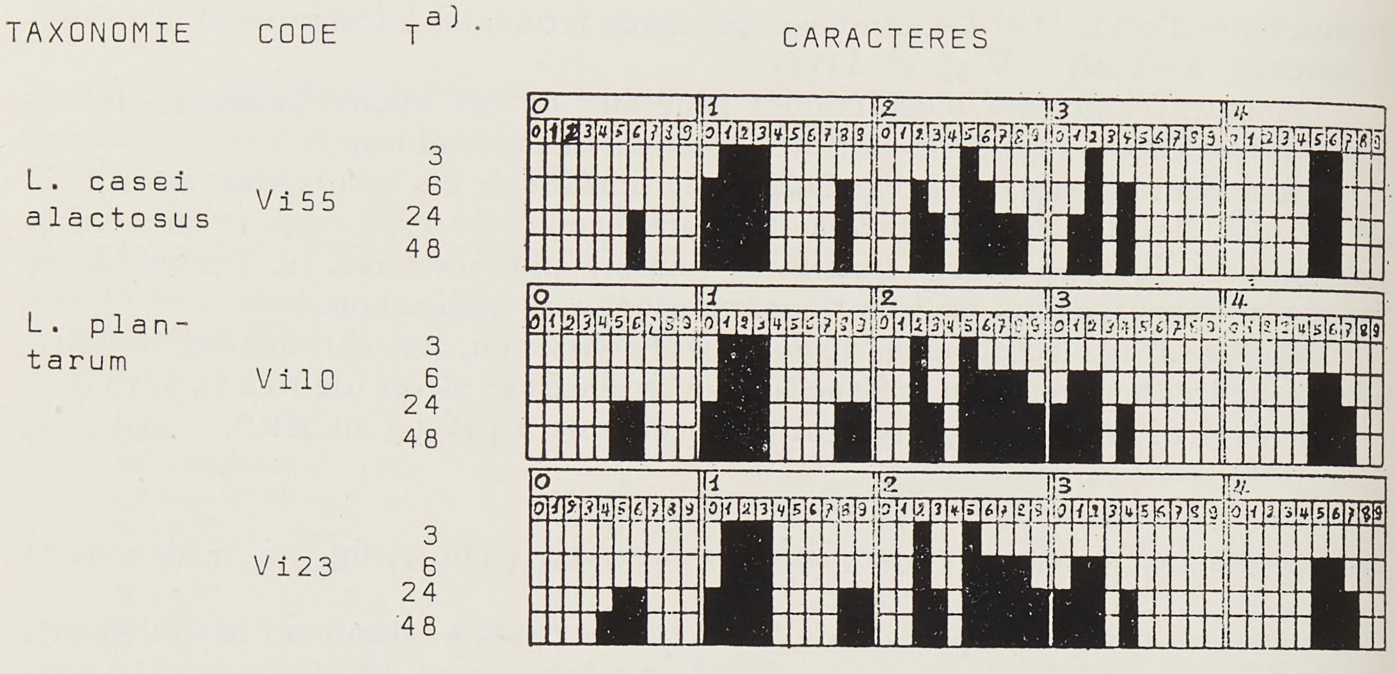
L'ensemble de ces souches se développe bien en présence de haute teneur en alcool, sauf à 15 p. 100 pour le *L. brevis* Vi27.

Les souches de ce groupe ne poussent pas ou très difficilement à pH 3,5.

TABLEAU 7

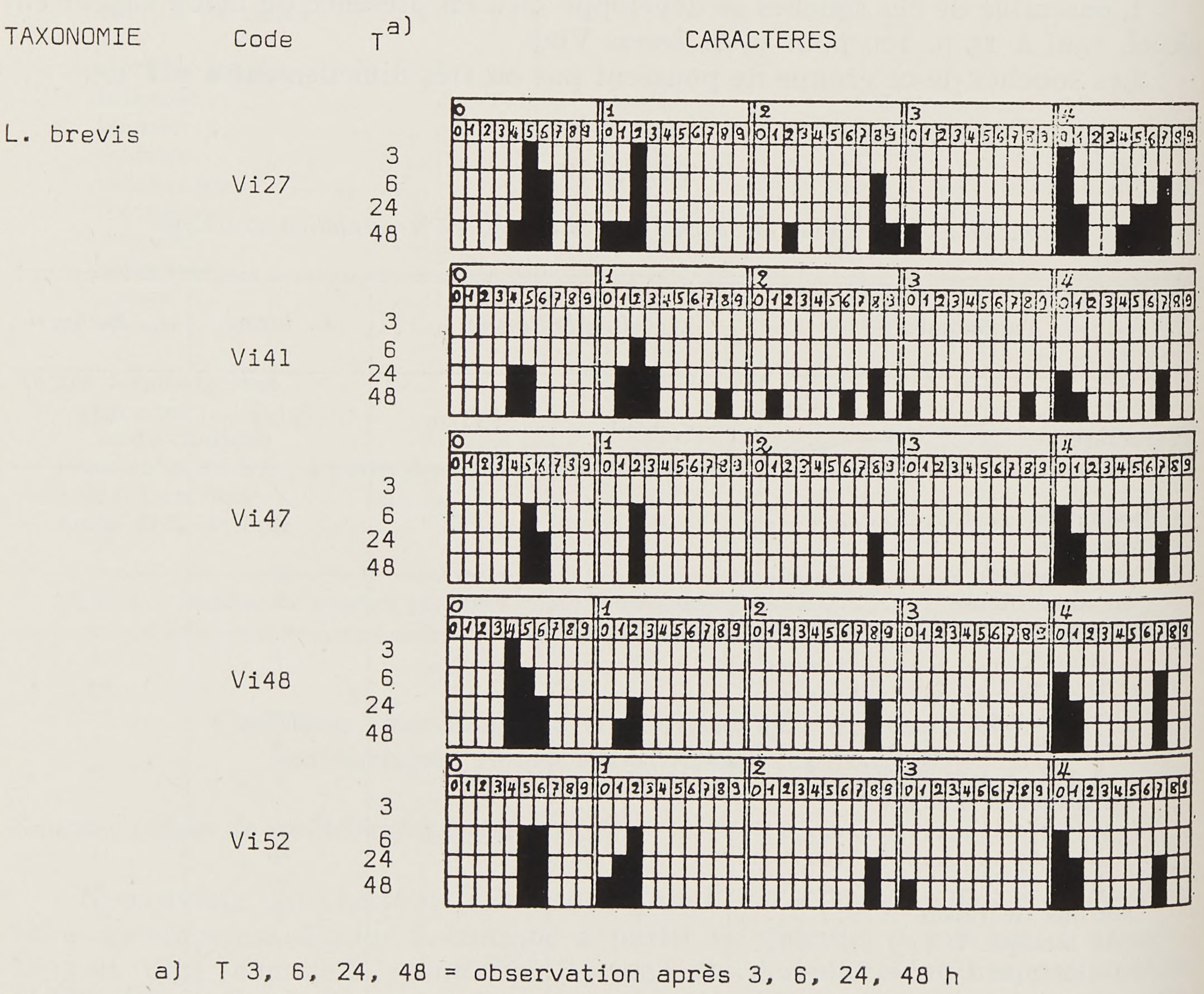
Caractères biochimiques de souches isolées de vins en fermentation alcoolique

Taxonomie	*L. plantarum*		*L. brevis*	*L. buchneri*
Caractères / Code	Vi23	Vi10	Vi27	Vi8
— Production de CO_2	—	—	+	+
— Croissance :				
en aérobiose	+	+	+	+
en anaérobiose	+	+	+	+
à 10 °C	—	—	—	—
à 30 °C	+	+	+	+
à 45 °C	—	—	—	—
à pH 3,5	—	—	—	—
à pH 4	+	+	+	+
à pH > 4 et à pH < 8	+	+	+	+
en présence d'alcool :				
à 5 %	+	+	+	+
à 10 %	+	+	+	+
à 15 %	+	+	—	+
sur jus de raisin	+	+	+	+
— Acide lactique L (+)	—	—	—	—
— Acide lactique L (+) et D (—)	+	+	+	+ L > D



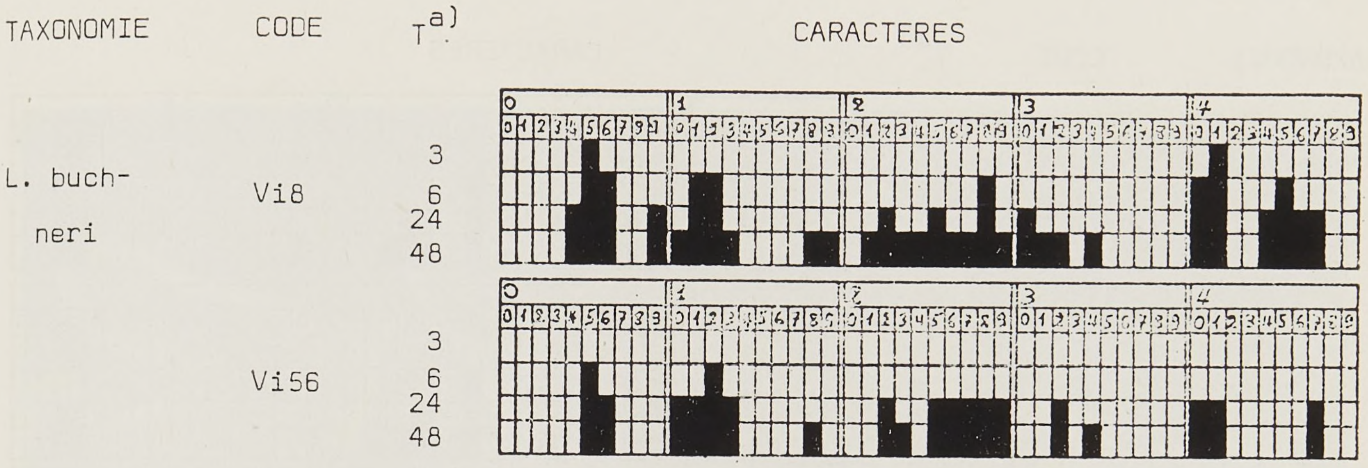
a) T 3, 6, 24, 48 = observation après 3, 6, 24, 48 h

FIG. 1. — *Profil d'apparition chronologique de divers caractères biochimiques, observés sur API tests, avec notations modifiées* (cf. tabl. 1) *de 40 à 49, des lactobacilles homofermentaires casei et plantarum isolés de divers vins du canton du Valais (Suisse).*



a) T 3, 6, 24, 48 = observation après 3, 6, 24, 48 h

FIG. 2. — *Profil d'apparition chronologique de divers caractères biochimiques, observés sur API tests, avec notations modifiées* (cf. tabl. 1) *de 40 à 49, des lactobacilles hétérofermentaires de type* L. brevis, *isolés de divers vins du canton du Valais (Suisse).*



a) T 3, 6, 24, 48 = observation après 3, 6, 24, 48 h

FIG. 3. — *Profil d'apparition chronologique de divers caractères biochimiques, observés sur API tests, avec notations modifiées* (cf. tabl. 1) *de 40 à 49, des lactobacilles hétérofermentaires de type* L. buchneri, *isolés de divers vins du canton du Valais (Suisse).*

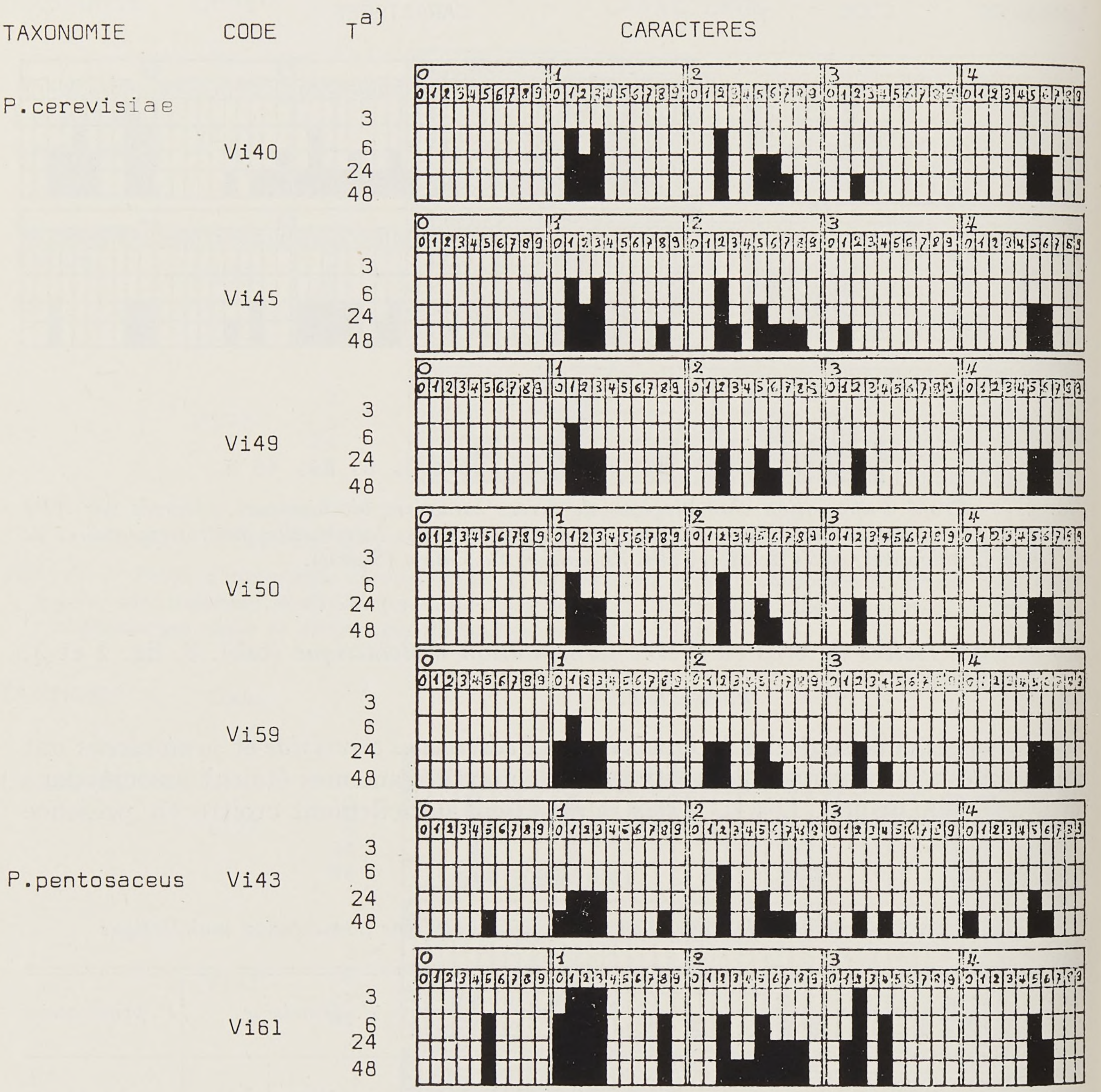
Les souches isolées de vins en pleine fermentation malolactique (tabl. 8, fig. 2 et 4, planches 2 et 3)

Dans ces vins, seuls des *L. brevis* et des *Pediococcus cerevisiae* et *pentosaceus* ont été trouvés. Très souvent les deux types de microorganismes étaient associés dans un même échantillon. Les *L. brevis* paraissaient difficilement croître en présence

TABLEAU 8

Caractères biochimiques de souches isolées de vins en pleine fermentation malolactique

Taxonomie	*L. brevis*			*P. cerevisiae*			*P. pentosaceus*
Caractères \ Code	Vi41	Vi47	Vi48	Vi40	Vi49	Vi50	Vi43
— Production de CO_2	+	+	+	—	—	—	—
— Croissance :							
en aérobiose	+	+	+	+	+	+	+
en anaérobiose	+	+	+	+	+	+	+
à 10 °C	—	—	—	+	—	+	+
à 30 °C	+	+	+	+	+	+	+
à 45 °C	—	—	—	—	—	—	—
à pH 3,5	—	—	—	—	+	+	—
à pH 4	+	+	+	+	+	+	+
à pH > 4 et à pH < 8	+	+	+	+	+	+	+
en présence d'alcool :							
à 5 %	+	+	+	+	+	+	+
à 10 %	+	+	+	+	+	+	+
à 15 %	—	—	—	+	+	+	+
sur jus de raisin	+	+	+	+	+	+	+
— Acide lactique L (+) et D (—)	+	+	+	+	+	+	+



a) T 3, 6, 24, 48 = observation après 3, 6, 24, 48 h

FIG. 4. — *Profil d'apparition chronologique de divers caractères biochimiques, observés sur API tests, avec notations modifiées* (cf. tabl. 1) *de 40 à 49, de quelques* Pediococcus cerevisiae *et de* Pediococcus pentosaceus, *isolés de divers vins du canton du Valais (Suisse).*

de 15 p. 100 d'alcool et à pH 3,5, tandis que les pédiocoques, au contraire, semblaient mieux supporter ces conditions extrêmes (cf. tabl. 8).

Le *L. brevis* Vi41 était capable de dégrader le mannitol (18+ sur API test) de même que le *P. pentosaceus* Vi43.

Les *L. brevis* fermentaient vigoureusement les pentoses et le fructose. Cette remarque s'applique aux *L. brevis* isolés de l'ensemble des échantillons. Tous les lactobacilles hétérofermentaires considérés par nous comme *L. brevis* sont en réalité très voisins des *L. hilgardii* en raison de leur tolérance aux hautes teneurs en acide et en alcool.

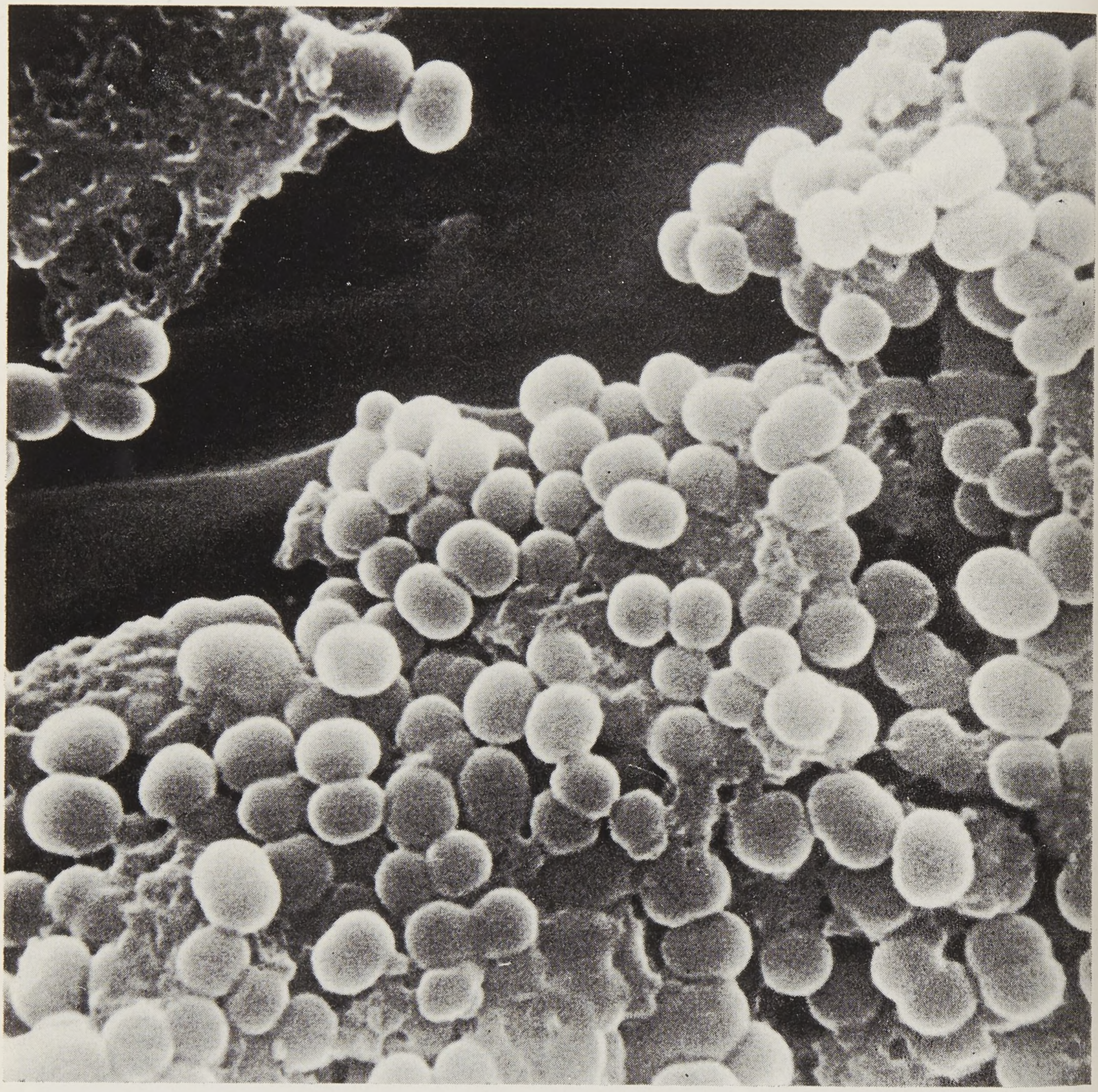


1 μm

PLANCHE 1

Lactobacillus plantarum; *aspect morphologique de la souche Vi23 observée au microscope électronique à balayage. Par place, un matériel muqueux enveloppe les corps bactériens.*

(échelle en microns)



1 µm

PLANCHE 2

Pediococcus cerevisiae; *aspect morphologique de la souche Vi49 observée au microscope électronique à balayage. Noter la présence d'un abondant matériel muqueux auquel les germes semblent adhérer.*

(échelle en microns)

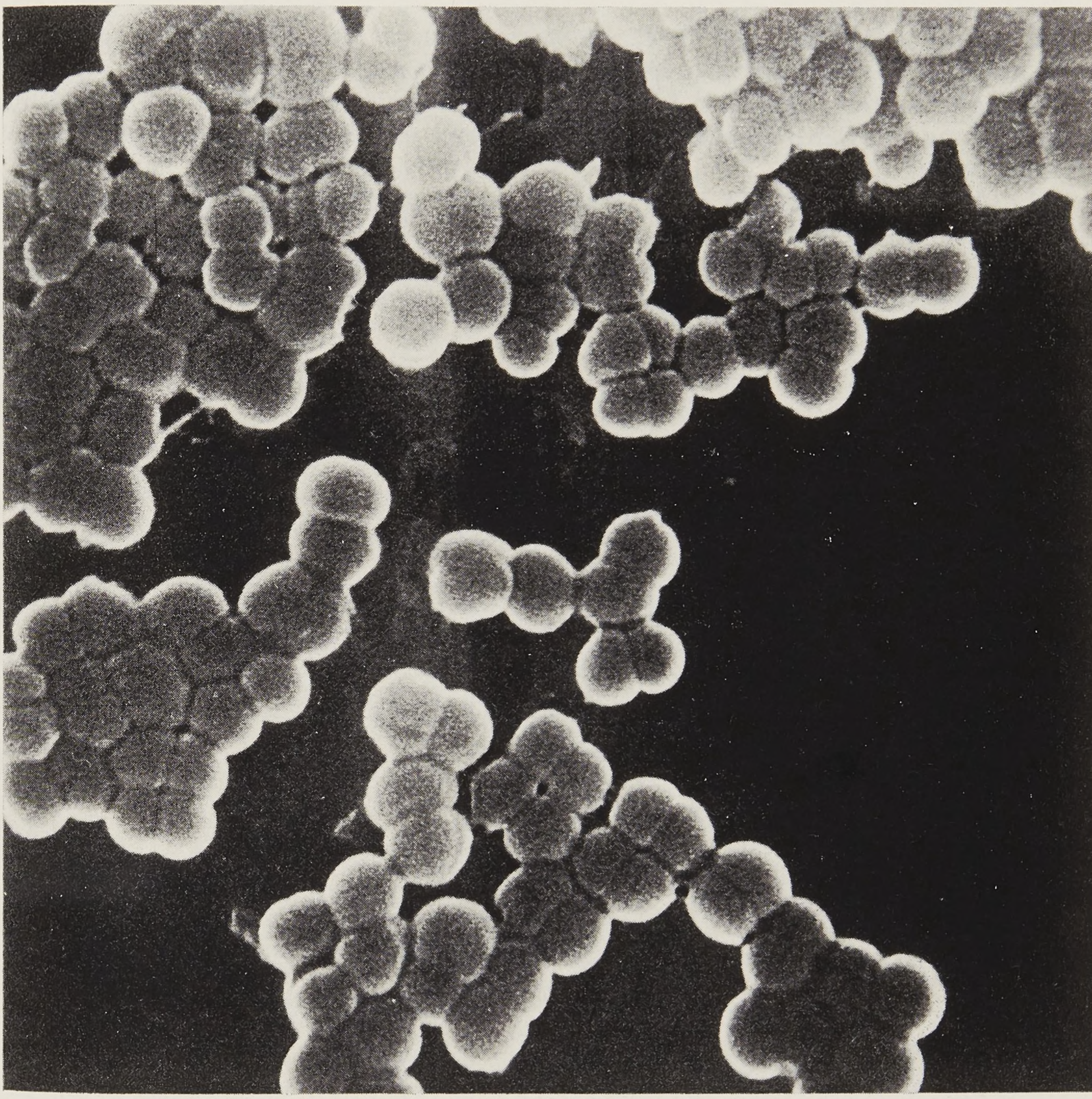


PLANCHE 3

Pediococcus pentosaceus; *aspect morphologique de la souche Vi43 observée au microscope électronique à balayage. Remarquer l'association en tétrades, caractéristique des pédiocoques.*

(échelle en microns)

Les souches isolées de vins ayant achevé leur fermentation malolactique (tabl. 9, fig. 1 à 4)

De ces échantillons, aucun *L. plantarum* n'a pu être isolé, mais par contre nous avons rencontré une souche de *L. casei alactosus.*

Dans trois vins, seuls des pédiocoques ont été trouvés; toutes les souches de ce groupe paraissaient mieux tolérer les milieux extrêmes en acidité et en alcool (cf. tabl. 9).

Le *L. buchneri* Vi56 et le *P. pentosaceus* Vi61 étaient capables de dégrader le mannitol (18+ sur API test).

La répartition par échantillon des diverses souches de lactobacilles et de pédiocoques isolées des moûts et des vins a été résumée par le tableau 10.

TABLEAU 9

Caractères biochimiques de souches ayant achevé leur fermentation malolactique

Taxonomie	*L. casei*	*L. brevis*	*L. buchneri*	*P. cerevisiae*		*P. pentosaceus*
Caractères / Code	Vi55	Vi52	Vi56	Vi45	Vi59	Vi61
— Production de CO_2	—	+	+	—	—	—
— Croissance :						
en aérobiose	—	+	+	+	+	+
en anaérobiose	+	+	+	+	+	+
à 10 °C	+	—	—	—	—	+
à 30 °C	+	+	+	+	+	+
à 45 °C	+	—	—	—	—	—
à pH 3,5	—	+	+	+	—	+
à pH 4	+	+	+	+	+	+
à pH > 4 et pH < 8	+	+	+	+	+	+
en présence d'alcool :						
à 5 %	+	+	+	+	+	+
à 10 %	+	+	+	+	+	+
à 15 %	+	+	+	+	—	+
sur jus de raisin	+	+	+	+	+	+
— Acide lactique L (+)	+					
— Acide lactique L (+) et D (—)		+	+	+	+	+

Conclusions

Ces microorganismes isolés de ces échantillons de vins valaisans se répartissaient en quatre groupes :

a) des *L. casei,*

b) des *L. plantarum,*

c) des *L. brevis,*

d) des *Pediococcus cerevisiae* et *pentosaceus.*

TABLEAU 10

Tableau récapitulatif de la répartition par échantillon des diverses souches de lactobacilles et de pédiocoques capables d'effectuer la fermentation malolactique, isolées de moûts et de vins du canton du Valais/Suisse

	Échantillons	Nombre de souches par échantillon					
		L. plantarum	*L. casei*	*L. brevis*	*L. buchneri*	*P. cerevisiae*	*P. pentosaceus*
Moûts au pressage	Fendant 1	6	2				
	Fendant 2	1					
	Fendant 3	3		1			
	Fendant 4	1		1			
Moûts en fermentation alcoolique	Johannisberg 1	1		1	1		
	Arvine	1					
Vins en fermentation malolactique	Riesling-Sylvaner ..					1	
	Fendant 5			1			
	Dôle 1			1			1
	Dôle 2			1		1	
	Pinot noir 2					1	
Vins après la fermentation malolactique	Johannisberg 2				1	1	
	Johannisberg 3		1				
	Malvoisie..........			1		1	
	Muscat					1	
	Œil-de-Perdrix						1

Les *L. casei* isolés de moûts (cf. tabl. 6) fermentaient le lactose, ils pouvaient donc être caractérisés comme des *L. casei casei*. Le *L. casei* de la dernière série (cf. tabl. 9) ne fermentait pas le lactose et appartiendrait donc à la sous-espèce *alactosus*.

Les moûts ont été trouvés très riches en *L. plantarum*, relativement moins en *L. casei* et *brevis*, et très pauvres en *Pediococcus* puisqu'aucune souche de coques n'a pu y être décelée.

Dans les échantillons considérés, les *L. plantarum* tendaient à diminuer durant la fermentation alcoolique, puis à disparaître vers l'époque de la fermentation malolactique. Dès la fin de la fermentation alcoolique la flore lactique (à l'exception des leuconostocs) était essentiellement constituée de pédiocoques et de lactobacilles hétérofermentaires.

L'utilisation des API tests fut très utile pour éviter au maximum le cumul de souches identiques et s'est révélée à elle seule presque suffisante pour la définition de la position systématique des microorganismes étudiés.

Afin de confirmer la généralisation possible de l'évaluation de la flore lactique telle qu'elle ressort de cette étude, nous avons entrepris d'examiner le comportement des populations microbiennes durant la vinification d'un même produit. Les premiers résultats obtenus n'ont fait que confirmer les observations présentées dans cet article.

Parmi les nombreuses souches présentes dans les moûts au début de la vinification, il apparaît que seules quelques-unes seront capables de survivre et de déclencher, le moment venu, les processus de la fermentation malolactique.

D'autres études complémentaires seraient nécessaires pour préciser la nature des facteurs les plus importants régissant cette sélection.

Les leuconostocs font également partie de la flore lactique de ces vins. Mais, lors de cette première étude, nous avons rencontré certaines difficultés d'isolement et de culture de ces importants microorganismes, aussi avons-nous entrepris à leur sujet un travail particulier que nous publierons ultérieurement.

Recu pour publication en juillet 1977.

Remerciements

Nous remercions Mme S. WEHRSPANN et M. N. D'AMICO de leur collaboration technique et le service de microscopie électronique de M. H. BAUER pour les microphotographies.

Summary

Malolactic flora of musts and wines from the Canton of Valais (Switzerland)

I. — *Lactobacilli and Pediococci*

The malolactic flora of musts and wines from the Canton of Valais (Switzerland) at various stages of fermentation was studied.

The isolated strains of lactobacilli and pediococci may be separated into four groups:

— group a : *Lactobacillus casei* (homofermentative).
— group b : *Lactobacillus plantarum* (homofermentative).
— group c : *Lactobacillus brevis* (heterofermentative).
— group d : *Pediococcus cerevisiae* and *pentosaceus* (homofermentative).

At the start of malolactic fermentation, the homofermentative lactobacilli, initially present, seem to have disappeared.

Once the alcoholic fermentation has been completed, the residual flora is essentially composed of heterofermentative lactobacilli and pediococci. Studies about leuconostoc also present in these wines will be published later.

The characterization of the strains was greatly simplified by using the tests « API 50 *Lactobacillus* system », from Vixotab (France).

Key-words: *Musts, wines, malolactic flora.*

Références bibliographiques

BARRE P., 1966. Recherches sur les bactéries lactiques des vins. I. — Isolement et classification. *Ann. Technol. agric.*, **15**, 173-180.

CARR J. G., 1957. Occurence and activity of some lactic acid bacteria from apple juices, ciders and perries. *J. Inst. Brew.*, **63**, 436-440.

CARR J. G., 1958. The vitamin requirements of lactic acid bacteria from ciders. *Antonie van Leoewenhoec* , **24**, 63-72.

DE MAN J. C., ROGOSA M., SHARPE E., 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bact.*, **23**, 130-135.

DU PLESSIS L. de W., VAN ZYL J. A., 1963. The microbiology of south-african wine making. Part IV. The taxonomy and incidence of lactic acid bacteria from dry wines. *S. Afr. J. Agric. Sci.*, **6**, 261-273.

FORNACHON J. C. M., 1964. A leuconostoc causing malo-lactic fermentation in Australian wines. *Amer. J. Enol. Viticult.*, **15**, 184-186.

INGRAHAM J. L., VAUGHN R. H., COOKE G. M., 1960. Studies on the malolactic organisms isolated from California wines. *Amer. J. Enol. Viticult.*, **11**, 1-4.

LAMBION R., MESKHI A., 1957. Les bactéries de la fermentation malolactique. *Rev. Ferment. Ind. Aliment.*, **12**, 131-144.

LUTHI H., 1958. La rétrogradation malolactique dans les vins et les cidres. *Rev. Ferm. Ind. alim.* (Bruxelles), **12**, 15-22.

MARET R., SOZZI T., 1976. Flore lactique de fromageries d'alpages suisses. *Le Lait*, LVI, 304-318.

MATTSON S., 1965. The determination of the configuration of lactic acid in bacterial cultures. *Milk and Dairy Research, Alnarp Sweden. Report*, n° 71.

PEYNAUD E., 1955. Neue gegebenheiten bezüglich des biologischen Saure abbaues. *Mitt. Klosternenberg*, **5**, 183-191.

PEYNAUD E., DOMERQ S., 1967. Étude de quelques bacilles homolactiques isolés de vins. *Arch. Mikrobiol.*, **57**, 255-270.

POITTEVIN N. E., CARRASCO A., GIOIA M. N., 1963. Estodios sobre la fermentation malolactica en vinos del Uruguay. IV. Estudios de las bacteria lacticas en vinificationes experimentales. *Rev. lat. amer. Microbiol.*, **6**, 147-158.

RADLER F., 1958. Untersuchung des biologischen Saure-abbaues im Wein. Isolierung und Charakterisierung von Apfelsäure-abbauen den Bakterien. *Arch. Mikrobiol.*, **30**, 64-72.

RADLER F., 1957. Experimenteller Abbau der Apfelsaure in Traubenmost. *Naturwissenschaften*, **44**, 232-233.

WEILLER H. G., RADLER F., 1970. Milchsäurebakterien aus Wein und von Rebenblättern. *Zbl. Bakt.*, II, **124**, 707-732.

YOSHIZUMI H., 1963. Studies on the bacteria found during the process of wine making. *Agric. Biol. Chem.*, **27**, 590-598.

Ann. Technol. Agr., 1977, **27** (3), 275-285.

Évolution de la vitamine C au cours du métabolisme anaérobie de la baie de raisin

Andrée OURNAC, C. POUX, P. ANDRÉ, M. BURET, Y. CHAMBROY, C. FLANZY

avec la collaboration technique de J.-L. BATTLE

Station d'Œnologie et de Technologie végétale
11104 Narbonne
Station de Technologie des Produits végétaux
I.N.R.A., Centre de Recherches d'Avignon
84140 Montfavet

Résumé

L'évolution de la vitamine C contenue dans des baies de raisin est suivie au cours de leur métabolisme anaérobie. La teneur totale diminue dès le début de l'anaérobiose et ne représente plus que 50 p. 100 de la valeur initiale après 10 jours à 35 °C, en atmosphère de CO_2. Durant cette période, la quantité de vitamine de la pellicule tend vers 0; la concentration en vitamine de la pulpe après une phase stationnaire ou de légère croissance, diminue elle aussi.

Ces phénomènes se retrouvent quels que soient le stade physiologique des baies, le cépage, la température d'expérience variant entre 15 et 35 °C, la nature de l'agent d'anaérobiose.

Des hypothèses sur les voies de catabolisme de l'ascorbate sont discutées. La possibilité d'une diffusion de la vitamine de la pellicule vers la pulpe est évoquée.

L'importance du système acide ascorbique-acide déhydroascorbique dans l'orientation du métabolisme anaérobie est suggérée.

Mots clés : *Métabolisme anaérobie, raisin, vitamine C.*

Introduction

Le métabolisme anaérobie (*), de baies de raisin, mûres, correspond à un ensemble complexe de phénomènes biochimiques (Journées Macération Carbonique, 1971). Afin de comprendre ces phénomènes et leurs interrelations, nous avons

(*) L'expression « métabolisme anaérobie » englobe des faits très divers comme la production d'éthanol, le métabolisme des acides organiques, la diffusion des polyphénols de la pellicule vers la pulpe; ces faits se déroulent dans des baies de raisin placées dans une atmosphère dont la teneur en oxygène est inférieure à 1 p. 100.

choisi de suivre puis d'interpréter l'évolution de quelques substrats du métabolisme intermédiaire présents dans le fruit : des acides organiques non cétoniques (FLANZY *et al.*, 1967), divers produits de la fermentation intracellulaire (FLANZY *et al.*, 1974), des substances azotées (FLANZY *et al.*, 1976).

L'étude de l'acide ascorbique (*) offre un intérêt certain pour la poursuite de ces objectifs. En effet, présent en quantités relativement importantes dans le raisin, soumis à de fortes fluctuations de concentration en cours de maturation (OURNAC et POUX, 1966) et lors de traitements technologiques (OURNAC, 1953), cet acide participe à un système oxydo-réducteur souvent actif dans les processus biologiques.

Aussi, durant quatre campagnes, nous avons mesuré les variations quantitatives de la vitamine C de baies de raisin mûres en fonction de la durée d'anaérobiose. En outre, nous avons abordé l'étude de l'influence d'autres facteurs : stade physiologique des fruits, cépage, température de l'enceinte expérimentale, nature de l'agent d'anaérobiose.

Méthodes et techniques

L'expérimentation a porté essentiellement sur du *Carignan noir* provenant, pour les quatre années, de la même vigne du domaine expérimental I.N.R.A. de Pech-Rouge (NARBONNE-GRUISSAN). Les raisins ont été récoltés à maturité (1967, 1968, 1969*b*, 1970*b*) ou à un stade intermédiaire entre la véraison et la maturité (1969*a*, 1970*a*) (tabl. 1).

Les baies détachées de la rafle sont distribuées en différents lots de 350 fruits selon la technique d'échantillonnage déjà décrite (FLANZY *et al.*, 1967). Ces lots sont enfermés dans des bocaux Keller de 1,5 litre dont l'atmosphère est formée d'anhydride carbonique (CO_2). Les bocaux sont alors placés dans une enceinte obscure à la température de 35 °C.

Après des durées échelonnées de stockage, les lots sont pressurés individuellement sous gaz inerte (CO_2) à l'aide d'un appareillage pneumatique développant une pression de 3 kg/cm^2 appliquée à deux reprises. Les moûts obtenus sont centrifugés 10 mn à 1 500 g. Chaque lot fournit donc une fraction moût correspondant au contenu vacuolaire et une fraction marc formée des pellicules, des parois cellulaires et du moût résiduel. La vitamine C se trouvant dans le raisin à la fois dans la pellicule et dans le moût (OURNAC et POUX, 1966), il est souhaitable de mesurer cet acide dans les deux fractions définies ci-dessus.

Le dosage a porté sur la vitamine totale, forme réduite + forme oxydée, précipitée en 2-4-dinitrophénylhydrazones selon la technique de ROE et KUETHER (1943), ROE et OESTERLING (1944) adaptée au raisin par OURNAC (1965, 1966). Les résultats sont généralement exprimés en milligrammes de vitamine C pour le moût, le marc ou l'ensemble (moût + marc) de 100 baies. Certaines mesures sont rapportées en milligrammes de vitamine C par litre de moût.

Parallèlement à cette expérimentation, des travaux complémentaires ont porté sur l'évolution de la vitamine C (des fractions moût) après des anaérobioses conduites à 15 °C ou 30 °C. D'autre part, l'influence de l'argon comme agent

(*) En cours d'exposé, nous utiliserons, indifféremment, les termes « vitamine C » ou « ascorbate » pour désigner le couple acide ascorbique-acide déhydroascorbique.

TABLEAU 1

Caractéristiques des moûts avant et après une anaérobiose de 10 jours à 35 °C

AT = acidité totale en g/l H_2SO_4 • S = sucres réducteurs en g/l • Vit C = vitamine C en mg/l • GL = éthanol acquis • Δ malate = $\frac{\Delta \text{ malate (initial-final)} \times 100}{\text{malate initial}}$ • MA = métabolisme anaér.
a = baies récoltées avant maturité; *b* = baies récoltées à maturité.

	Année	1967	1968	1969*a*	1969*b*	1970*a*	1970*b*
Départ	AT.......	5,4	5,2	8,2	7,2	15,0	5,9
	S	197	209	170	185	134	200
	Vit C	57	52	45	52	79	50
MA 10 jours	°GL	1°60	1°75	/	1°23	0°56	1°40
	Δ malate .	50	55	/	50	/	59

d'anaérobiose a été comparée à celle du CO_2. Enfin, quatre autres cépages ont été utilisés; il s'agit de l'*Aramon*, le *Grenache blanc*, le *Grenache noir* et le *Terret Bourret*.

Pour chacun de ces essais, le protocole expérimental suivi a été identique à celui décrit en tête de chapitre. Seuls les stockages des quatre nouveaux cépages ont été réalisés dans des cuves de verre de 10 l.

Résultats

Remarque préliminaire

Dans les différents essais, les deux critères que nous retenons généralement pour suivre la progression du métabolisme anaérobie, formation d'éthanol d'une part et pourcentage de malate catabolisé d'autre part, présentent des valeurs conformes aux normes après 10 jours d'anaérobiose à 35 °C (tabl. 1).

Variations quantitatives de la vitamine C (fig. 1)

La vitamine C contenue dans les différentes fractions des baies de *Carignan* placées à 35 °C dans une atmosphère de CO_2 présente des allures d'évolution très voisines pour les quatre années d'essais.

La teneur en vitamine C totale diminue constamment au cours du métabolisme

TABLEAU 2

Évolution de la vitamine C au cours de l'anaérobiose

$$\text{Total} = \frac{\Delta \text{ vitamine C totale de 100 baies (initial-final après 10 j d'anaérobiose)} \times 100}{\text{vitamine C totale initiale}}$$

$$\text{Moût } \Delta_3 \ (\Delta_{10}) = \frac{\Delta \text{ vitamine C du Moût (initial-final après 3 ou 10 j d'anaérobiose)} \times 100}{\text{vitamine C du moût initial}}$$

$$\text{Marc } \Delta_3 \ (\Delta_{10}) = \frac{\Delta \text{ vitamine C du Marc (initial-final après 3 ou 10 j d'anaérobiose)} \times 100}{\text{vitamine C du marc initial}}$$

Année	Total	Moût		Marc	
		Δ_3	Δ^{10}	Δ_3	Δ^{10}
1967	— 54	— 2	— 29	— 44	— 82
1968	— 43	+ 19	— 9	— 52	— 94
1969*a*	/	+ 40	/	— 54	/
1969*b*	— 49	0	0	— 59	— 96
1970*a*	/	0	— 80	/	/
1970*b*	— 59	+ 31	— 19	— 36	— 86

anaérobie. Le pourcentage de vitamine C perdue après 10 jours de stockage par rapport à la quantité de vitamine initiale se situe entre 40 et 60 p. 100 (tabl. 2).

La quantité de vitamine C retrouvée dans le marc de 100 baies décroît et tend vers 0 aux alentours du quinzième jour.

Les pertes sont de l'ordre de 40 à 60 p. 100 après 3 jours et atteignent 90 p. 100 au dixième jour (tabl. 2).

Les courbes représentatives de la concentration de l'ascorbate dans le moût présentent un palier ou une croissance suivis d'une chute. Dans le cas d'une première phase de croissance, le maximum est atteint vers le troisième jour. Puis, pour les baies mises en anaérobiose au stade mûr, la quantité de vitamine C atteint la valeur mesurée au départ vers le huitième jour.

Correspondant, au départ et après 3 jours d'anaérobiose, à 50-60 p. 100 de la teneur totale initiale, la vitamine du moût représente, après 10 jours 40 à 50 p. 100 de la teneur totale initiale et 90 p. 100 de la teneur totale finale (tabl. 3).

La concentration dans le moût est supérieure ou égale à celle du départ après 3 jours d'anaérobiose; elle chute de 0 à 30 p. 100 au dixième jour (tabl. 2).

TABLEAU 3

Taux de vitamine C dans le moût

Départ p. 100 total = vitamine C du moût au départ/vitamine C totale au départ.
3 (10) jours p. 100 total départ = vitamine C du moût après 3 (10) jours/vit C totale au départ
3 (10) jours p. 100 total après 3 jours = vitamine C du moût après 3 (10) jours/vit C totale après 3 (10) jours.

Année	Départ % total	3 jours		10 jours	
		% total 3 jours	% total départ	% total 10 jours	% total départ
1967	60	75	59	90	43
1968	60	76	71	91	52
1969*a*	41	70	57	/	/
1969*b*	51	75	51	92	49
1970*b*	48	65	62	82	37

Influence du stade physiologique (fig. 1)

La comparaison des courbes 1969*a* et 1969*b* d'une part, 1970*a* et 1970*b* d'autre part, met en évidence une grande analogie entre l'évolution de l'ascorbate dans les fruits mûrs et dans les fruits cueillis plus précocement. Pour ces derniers les phénomènes de catabolisme semblent accélérés par rapport à ceux observés pour les fruits mûrs.

Influence du cépage (fig. 2)

Les différents cépages présentent des allures d'évolution proches les unes des autres avec des décalages dans le temps. Les retards présentés parfois par les courbes de la figure 2 par rapport à celles de la figure 1 correspondent, peut-être, aux conditions différentes de stockage des deux types d'expérimentation. Dans celui relatif aux essais « cépages » réalisés en cuves de 10 l le rapport volume gazeux / volume des baies est plus important que celui des essais bocaux; d'autre part, la saturation de l'atmosphère des cuves par le CO_2 n'est pas assurée aussi rigoureusement qu'en bocaux.

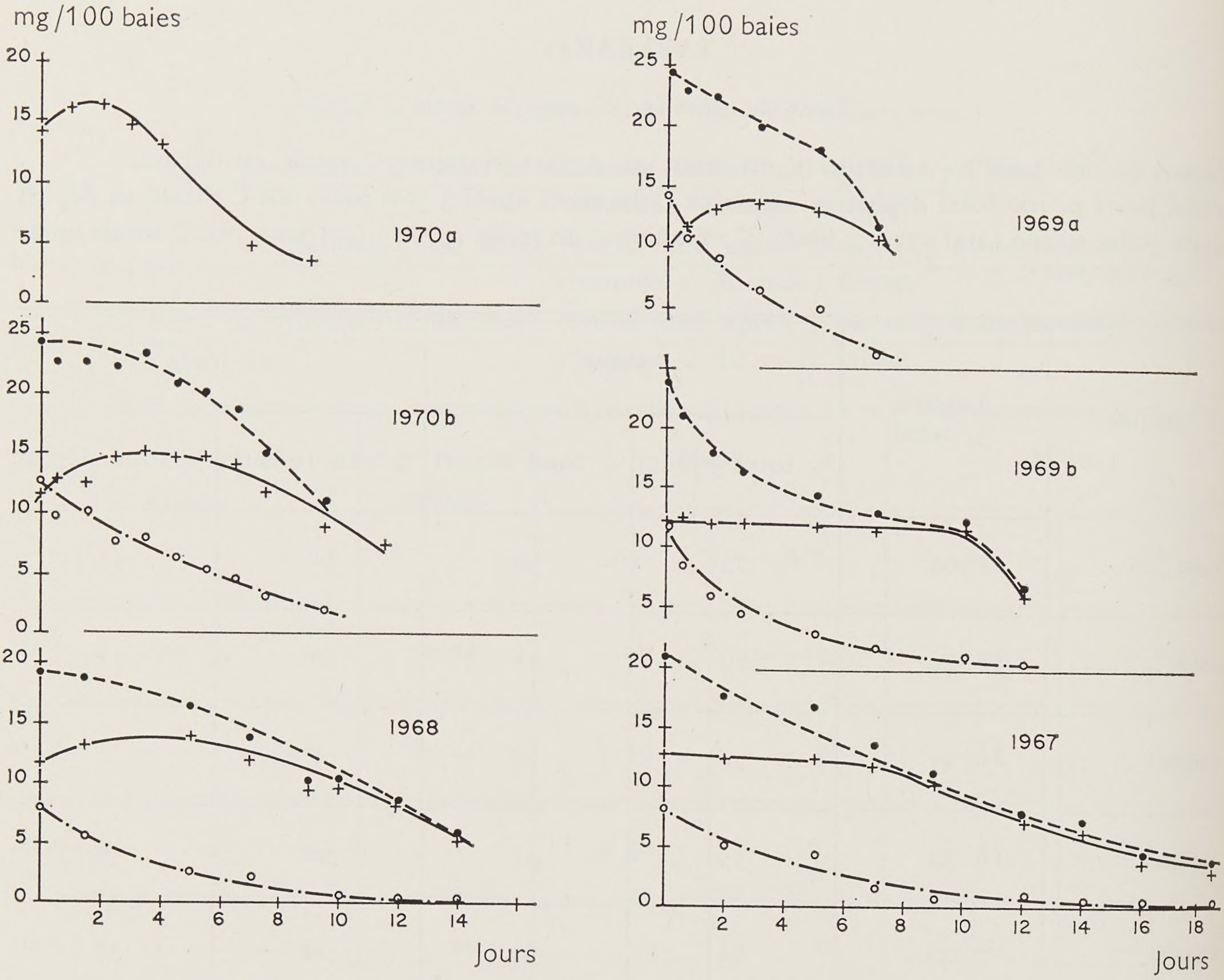


FIG. 1. — *Évolution de la teneur en vitamine C au cours du métabolisme anaérobie.*

mg/100 baies • *Carignan* • 35 °C • CO_2

a = avant maturité; *b* = à maturité.

×———× moût

○—-—-○ marc

● - - - - -● total contenu dans 100 baies

Influence de la température d'anaérobiose (tabl. 4)

La diminution de la teneur du moût en vitamine C intervient d'autant plus tard que la température d'anaérobiose est plus basse. Ainsi, à 15 °C l'amorce de la décroissance s'observe une dizaine de jours après celle enregistrée à 35 °C.

Influence de l'agent d'anaérobiose (fig. 3)

Les allures des phénomènes sont sensiblement les mêmes que l'anaérobiose soit provoquée par l'argon ou par le CO_2.

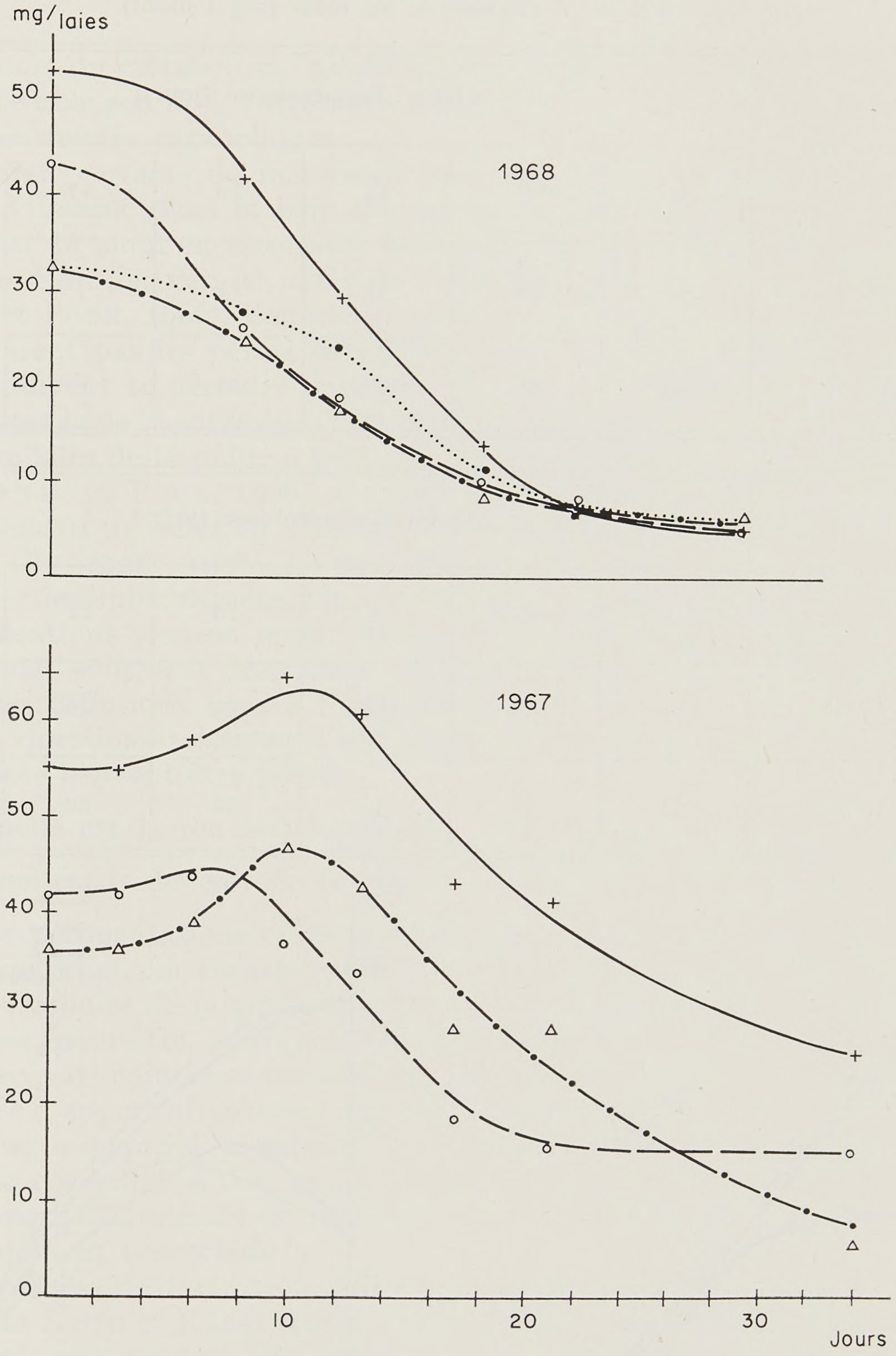


FIG. 2. — *Évolution de la vitamine C du moût des baies de différents cépages au cours de leur métabolisme anaérobie.*

mg/litre • 35 °C • CO_2 • Cuves verre.

TABLEAU 4

Influence de la température d'expérience
sur l'évolution de la vitamine C du moût (mg /l moût)

	θ°C	Durée d'anaérobiose (jours)					
		0	7	14	20	27	40
1967	35 °C.....	57	56	31	17	/	/
	15 °C.....	57	56	56	52	50	43

	θ°C	Durée d'anaérobiose (jours)					
		0	2 1/2	5	10	12	17
1969*b*	35 °C.....	52	56	54	53	26	/
	30 °C.....	52	56	56	56	49	35

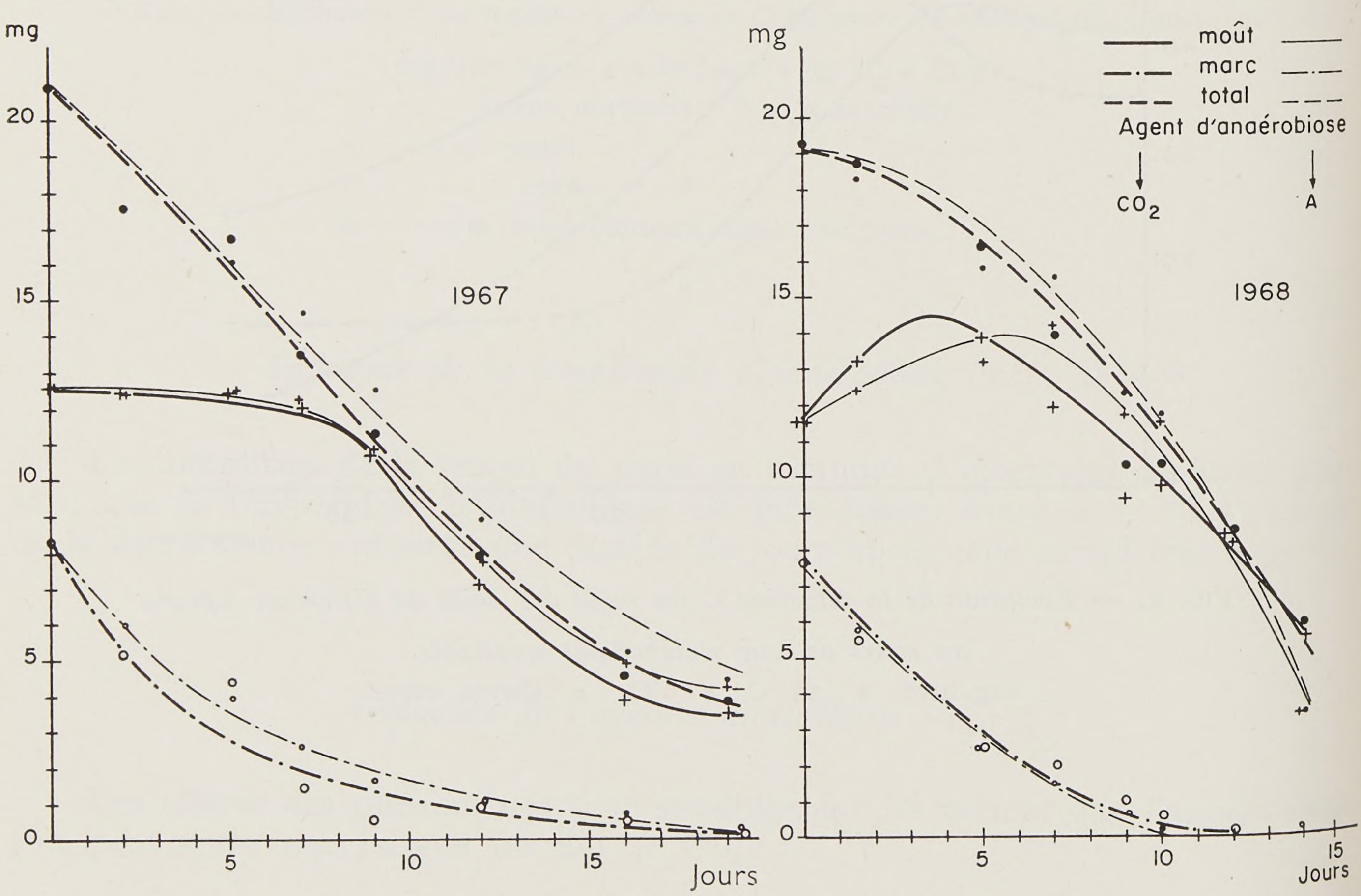


FIG. 3. — *Influence de « l'agent d'anaérobiose » sur l'évolution de la vitamine C*
mg/100 baies • 35 °C.

Discussion

Au cours du métabolisme anaérobie des raisins, la vitamine C contenue dans les baies semble soumise, entre autres évolutions, à des processus de transfert et à des phénomènes cataboliques.

En effet, certains de nos essais font apparaître une chute de la quantité totale de vitamine dans la baie accompagnée d'une augmentation momentanée de la teneur du moût en ascorbate. Ceci peut être interprété comme la manifestation d'une diffusion vers le moût de l'ascorbate de la pellicule qui en est riche (OURNAC et POUX, 1966). Comme les gains en ce substrat, mesurés dans le moût, ne compensent pas les pertes enregistrées dans le marc, des transformations de vitamine doivent se dérouler parallèlement aux phénomènes de diffusion.

Le passage de la vitamine C localisée dans la pellicule vers le contenu vacuolaire des cellules de la pulpe a déjà été observé en d'autres moments de la vie du fruit (OURNAC et POUX, 1966). Ce type de transfert se retrouve d'ailleurs avec l'enrichissement du moût en substances polyphénoliques au cours du métabolisme anaérobie (BOURZEIX, 1971). La migration de ces substances d'un tissu à un autre implique, vraisemblablement, des évolutions de perméabilités membranaires et des modifications plus ou moins profondes de structures cellulaires. Cependant, nos résultats, seulement descriptifs, ne peuvent permettre de comprendre les raisons de ces diffusions liées à l'anaérobiose.

Deux questions relatives à la transformation de la vitamine C au cours de l'anaérobiose peuvent être posées :

1° Quelle est la (ou les) localisation anatomique du catabolisme?

2° Quel est le devenir de la vitamine C au cours de ce catabolisme?

Nos expérimentations ne permettent pas d'apporter de réponse nette à la première question. La transformation de l'ascorbate pourrait s'effectuer tant au niveau des cellules de la pellicule qu'à celui de la pulpe. Cette dernière solution expliquerait, peut-être, pourquoi, dans deux essais, la concentration en vitamine du moût se soit maintenue sensiblement constante durant 8 à 10 jours. En effet, si la vitesse d'apport de substrat par diffusion est égale à la vitesse de transformation *in situ*, la quantité de substrat ne doit pas varier. La généralisation de cette proposition conduirait à dire que le niveau de la teneur en vitamine du moût est lié au rapport des vitesses de diffusion et de catabolisme.

Que devient l'ascorbate?

La synthèse de tartrate à partir d'ascorbate dans des baies de raisin a été avancée par SAITO et KASAI (1969). Corroborée par certains (WAGNER et LOEWUS, 1974) rejetée par d'autres (RUFFNER et RAST, 1974), cette hypothèse n'a pu être nettement vérifiée au cours d'un essai personnel (1970). Après injection d'acide ascorbique-1-^{14}C dans des baies placées à 35 °C dans une atmosphère de CO_2, la radioactivité récupérée après 3 jours d'anaérobiose se retrouve principalement dans les produits réducteurs volatils et le shikimate. Le tartrate ne contient que 5 p. 100 de la radioactivité totale mesurée en fin d'essai.

Dans ces conditions, si la voie ascorbate-tartrate ne semble pas très active dans nos conditions expérimentales, il paraît intéressant, en revanche de chercher à préciser les relations existant entre le catabolisme de l'ascorbate d'une part, la synthèse du shikimate et de ses dérivés aromatiques potentiels d'autre part (JOURET, MOUTOUNET et DUBOIS, 1972).

L'évolution de la vitamine C du raisin en anaérobiose peut être un facteur important dans l'orientation des voies du métabolisme anaérobie. En effet, durant la dizaine de jours que nous considérons habituellement comme la période de grande activité d'un métabolisme anaérobie conduit à 35 °C, la teneur en vitamine C du contenu vacuolaire est constante ou augmente. Cette vitamine transite par le cytoplasme qui va donc contenir des quantités relativement grandes d'un système oxydo-réducteur non négligeable. Une telle présence dans le cytoplasme ne favorise-t-elle pas la canalisation des voies métaboliques vers des réactions de type réducteur? Par exemple, une induction de la séquence malate → fumarate → succinate, pourrait avoir lieu (FLANZY *et al.*, 1976).

Conclusion

Au cours du métabolisme anaérobie, la vitamine C totale de la baie de raisin mûr est progressivement transformée. La teneur du moût diminue, souvent après un enrichissement passager. La pellicule s'appauvrit rapidement et très fortement.

L'allure de cette évolution est générale quel que soit le stade physiologique des baies, le cépage, la température ou la nature de l'agent d'anaérobiose. Les différences entre facteurs jouent seulement au niveau des vitesses d'apparition des phénomènes. La vitamine C des fruits en cours de maturation semble évoluer plus rapidement que celle des fruits mûrs. La vitesse de transformation croît avec la température d'expérience dans les limites de 15 à 35 °C.

Le devenir de la vitamine C au cours du métabolisme anaérobie ne peut être précisé. Cependant, s'il est improbable que la synthèse de tartrate représente la voie principale du catabolisme de l'ascorbate, il est possible qu'une filiation assez étroite existe entre cet acide et des composés aromatiques du type shikimate.

Reçu pour publication en juillet 1977.

Summary

Vitamin C evolution during the anaerobic metabolism of grapes

The vitamin C evolution in grapes is studied during their anaerobic metabolism. The total content diminishes from the very beginning of the anaerobiosis, and after 10 days under 35 °C and CO_2 condition, only 50 p. 100 of the initial value are left. During this period, the vitamin quantity of the epiderm drifts to 0. The vitamin concentration of the flesh is also diminishing after a stationary phasis or after a slight growth.

These phenomena can be observed whatever the physiological stage of grapes or the vine-plant and independently of temperature (varying from 15° to 35 °C) and the agent of anaerobiosis.

Some theories concerning the ways of the ascorbate catabolism are discussed. Vitamin C diffusion from the epiderm into the flesh is evoked.

The importance of the ascorbic acid — dehydroascorbic acid system in the orientation of the anaerobic metabolism is suggested.

Key words: *Anaerobic metabolism, grapes, vitamin C.*

Références bibliographiques

BOURZEIX M., 1971. La diffusion des composés phénoliques au cours de la fermentation intracellulaire. C.R. Journées Macération Carbonique. 10-11 février 1971, 47-61. I.N.R.A. Montfavet-Avignon.

FLANZY C., ANDRÉ P., FLANZY M., CHAMBROY Y., 1967. Variation quantitatives des acides organiques stables, non cétoniques, non volatils, dans les baies de raisin placées en anaérobiose carbonique. *a*) Influence de la température. *b*) Influence de la durée d'anaérobiose. *Ann. Technol. Agric.*, **16**, *a*) 27-34; *b*) 89-107.

FLANZY C., ANDRÉ P., BÉNARD P., BURET M., CHAMBROY Y., JOURET C., 1974. Fermentation intracellulaire des baies de raisin au cours de leur métabolisme anaérobie. *Ann. Technol. Agric.*, **23**, 481-500.

FLANZY C., ANDRÉ P., BURET M., CHAMBROY Y., FLANZY M., 1976. Évolution des substances azotées au cours du métabolisme anaérobie de la baie de raisin. *Ann. Technol. Agric.*, **25**, 175-190.

FLANZY C., ANDRÉ P., BURET M., CHAMBROY Y., GARCIA P., 1976. Voies de catabolisme du malate au cours du métabolisme anaérobie des baies de raisin. *Ann. Technol. Agric.*, **25**, 125-142.

JOURET C., MOUTOUNET M., DUBOIS P., 1972. Formation du vinyl benzène lors de la fermentation alcoolique du raisin. *Ann. Technol. Agric.*, **21**, 69-72.

Journées Macération Carbonique 10-11/11/1971. I.N.R.A. — Montfavet-Avignon.

OURNAC A., 1953. Recherches sur la variation de la teneur en acide ascorbique et en facteur P du jus de raisin en fonction de son mode de préparation. *Ann. Technol. Agric.*, **2**, 99-111.

OURNAC A., 1965. Étude du dosage de l'acide ascorbique dans les vins et dans les jus fortement colorés. *Ann. Technol. Agric.*, **14**, 341-347.

OURNAC A., 1966. Évolution de l'acide ascorbique pendant la fermentation alcoolique du jus de raisin frais et du jus de raisin désulfité et la conservation des vins correspondants. *Ann. Technol. Agric.*, **15**, 181-191.

OURNAC A., POUX C., 1966. Acide ascorbique dans le raisin au cours de son développement. *Ann. Technol. Agric.*, **15**, 193-202.

ROE J. H., KUETHER C. A., 1943. The determination of ascorbic acid in whole blood and urine though the 2-4-dinitrophenyl hydrazine derivative of dehydroascorbic acid. *J. Biol. Chem.*, **147**, 399-407.

ROE J. H., OESTERLING M. J., 1944. The determination of dehydroascorbic acid and ascorbic acid in plant tissues by the 2-4-dinitrophenyl-hydrazine method. *J. Biol. Chem.*, **152**, 511-517.

RUFFNER H., RAST D., 1974. Die biogenese von tartrat in der Weinrebe. *Z. Pflanzenphysiol.*, **73**, 45-55.

SAITO K., KASAI Z., 1969. Tartaric acid synthesis from L. ascorbic acid - 1 - ^{14}C in grape berries. *Phytochem.*, **8**, 2177-2182.

WAGNER G., LOEWUS F. A., 1974. L. ascorbic acid metabolism in Vitaceae. Conversion to (+) tartaric acid and hexoses. *Plant Physiol.*, **54**, 784-787.

Ann. Technol. Agri., 1977, **27** (3), 287-293.

Étude comparative des arômes de champignons crus et cuits

(Agaricus bisporus L.)

Annie CARD et Cl. AVISSE

Station de Technologie des Produits Végétaux, I.N.R.A.
Centre de Recherches de Dijon, 7, rue Sully, BV 1540,
21034 Dijon Cedex

Résumé

Les auteurs ont analysé l'arôme du champignon cru et du champignon cuit (*Agaricus bisporus L.*).

Après avoir étudié différents solvants organiques pour l'extraction liquide-liquide, la séparation des constituants de l'arôme a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse, et la caractérisation des composés s'est faite par couplage à un spectromètre de masse.

Il a été mis en évidence une augmentation des proportions des composés carbonylés, après la cuisson.

Enfin, ce travail a permis d'établir la structure trans de l'octène 2-ol 1, un des composés responsables de l'arôme du champignon cru.

Mots clés : *champignon, arôme, cuisson.*

Introduction

Les constituants volatils qui participent à l'arôme du champignon frais semblent aujourd'hui bien connus. CRONIN et WARD (1971) ont résumé les études antérieures et montré que les composés responsables de l'arôme du champignon frais sont essentiellement des alcools et cétones aliphatiques à huit atomes de carbone. Des travaux plus récents de DIJKSTRA et WIKEN (1976) et PYYSALO (1976) ont confirmé ces résultats. Les constituants qui participent à l'arôme du champignon cuit semblent moins connus. PICARDI et ISSENBERG (1973) notent seulement une variation de la concentration en octène-1-ol 3.

Nous avons tenté une étude comparative des arômes de champignons crus et cuits, et les résultats montrent qu'il apparaît de nouveaux composés et une modification de la proportion relative des différents constituants.

Matériel et méthodes

A. — *Extraction*

1. — *Champignons frais*

Des champignons (5 kg) sont lavés puis broyés dans un litre d'eau distillée en présence d'air dans un mixer type Turmix. Le broyat est filtré sur une toile de polyamide et le filtrat est transféré dans un ballon. Pour récupérer les composés volatils, on utilise un évaporateur à film grimpant analogue à celui décrit par BARTOLODEW (1949). L'utilisation de cet extracteur présente l'avantage de ne chauffer le jus à extraire qu'à une température de l'ordre de 40 °C et pendant seulement quelques secondes. L'entraînement à la vapeur d'eau sous pression atmosphérique ou l'extraction par l'appareil de LIKENS et NICHERSON (1964) n'ont pas été utilisés pour éviter le risque de former des produits de chauffage.

Le distillat obtenu, riche en produits volatils est alors extrait au moyen de solvants organiques.

Les différents solvants essayés sont : pentane, hexane, éther éthylique, benzène, chlorure de méthylène, 1,1,2 trichlor-tri-fluoréthane (génétron 113).

Aucun n'est réellement satisfaisant, car après 5 extractions de 24 heures, chacune sous agitation magnétique, la phase aqueuse sent toujours le champignon. Le pentane permettant toutefois la meilleure extraction, sera seul utilisé par la suite. Notons que ce solvant a été préalablement lavé à l'acide sulfurique afin d'éliminer les dérivés aromatiques qui y sont contenus. Après un lavage à l'eau et une purification par distillation, le pentane est prêt à être utilisé.

La phase organique obtenue après extraction est séchée sur sulfate de sodium puis concentrée par distillation.

2. — *Champignons cuits*

Deux méthodes ont principalement été utilisées pour obtenir la fraction aromatique.

a) dans un ballon surmonté d'une colonne à rectifier type Vigreux, on introduit 5 kg de champignons broyés préalablement dans un litre d'eau distillée en présence d'air dans un mixer type Turmix. Le mélange est chauffé à l'aide d'un chauffe-ballon et on maintient l'ébullition pendant vingt minutes;

b) à la sortie d'un blancheur industriel nous avons capté les vapeurs qui ont été condensées dans un réfrigérant à circulation d'eau à 15° et le liquide obtenu a été recueilli dans un récipient maintenu à 0 °C. Le liquide aromatique a été finalement stabilisé, en vue du transport de l'usine au laboratoire, par du fluorure de sodium.

Ensuite, une technique identique à celle décrite pour le champignon cru est utilisée pour extraire la fraction volatile.

B. — *Analyse*

La séparation et l'analyse des composés volatils des extraits se font en utilisant le couplage du chromatographe en phase gazeuse et du spectromètre de masse. Les conditions d'analyse sont indiquées dans le tableau I.

TABLEAU I

Conditions d'analyse

Chromatographie en phase gazeuse	Spectrométrie de masse
Appareil PERKIN ELMER modèle 880	Appareil VARIAN MAT CH5
Colonne : acier inox 3 m, 1/8 pouce ; carbowax 20 M 2,5 % sur chromosorb W	Séparateur de gaz : WATSON-BIEMANN
Gaz Hélium 25 ml/mn; Azote 35 ml/mn	Température de source 250 °C
Température programmée de 60 à 200 °C à 2 °C/mn.	Énergie de bombardement électronique 70 eV
	Courant de cathode 100 ou 300 uA

Les composés sont identifiés d'après les volumes de rétention et les spectres de masse. Les produits de référence proviennent du commerce, à l'exception de l'octène-2-ol-1 qui a été synthétisé par réduction de l'acide octène-2 oïque au moyen de l'hydrure double de lithium et d'aluminium.

$$CH_3 - (CH_2)_4 - CH = CH - COOH \xrightarrow[\text{éther éthylique}]{\text{Li Al } H_4}$$

$$CH_3 - (CH_2)_4 - CH = CH - CH_2OH$$

L'acide octénoïque a lui-même été préparé par réaction de PERKIN selon les conditions proposées par LINSTEAD *et al.* (1933).

$$CH_3 - (CH_2)_4 - CHO + CH_2\begin{matrix} \diagup COOH - CO_2 \\ \diagdown COOH \end{matrix} \xrightarrow[\text{pyridine + pipéridine}]{- H_2O}$$

$$CH_3 - (CH_2)_4 - CH = CH - COOH.$$

Résultats et discussion

Les figures 1 et 2 et le tableau 2 rendent compte des résultats obtenus en couplage chromatographie en phase gazeuse — spectrométrie de masse. Au point de vue des différences qualitatives parmi les produits volatils des champignons cuits et crus, on note qu'il apparaît au cours de la cuisson deux dérivés furanniques, le furfural et le méthylfurfural. Nous n'avons pas trouvé d'acétophénone dans l'extrait de champignon cru. Les différences quantitatives sont plus importantes. Les chromatogrammes indiquent pour le champignon cuit une plus grande propor-

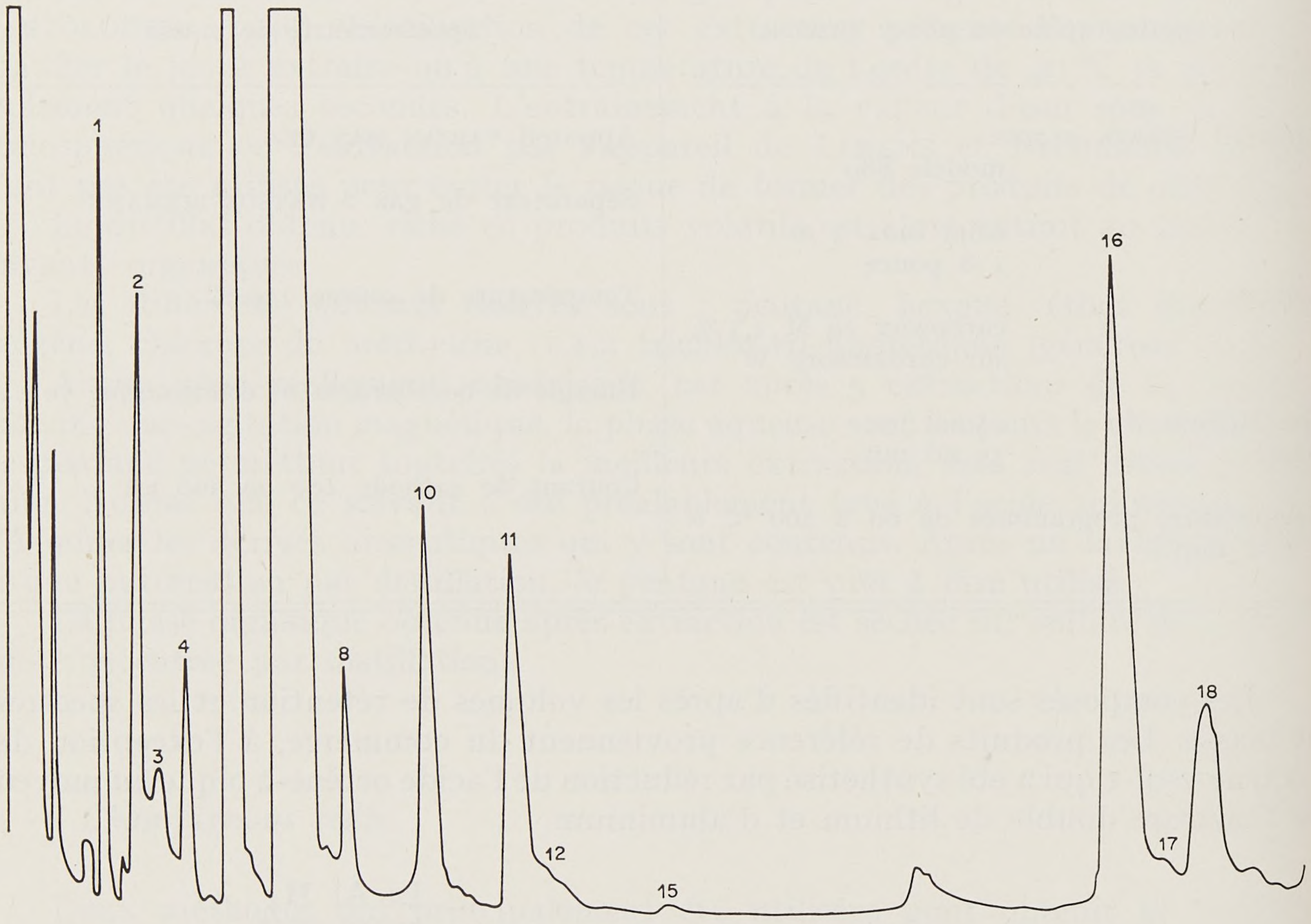


FIG. 1. — *Aromagramme du champignon cru.*

tion d'aldéhyde benzoïque, d'octène-1-one 3, d'octanone-3 donc de tous les composés carbonylés à l'exception du phénylacétaldéhyde qui existe en faible quantités dans le carpophore cru et cuit. Les autres composés majeurs : isopentanol, octanol-3, octène 1-ol-3, octène-2-ol-1, alcool benzylique, existent sensiblement dans les mêmes proportions. Nos résultats diffèrent de ceux obtenus par PICARDI et ISSENBERG (1973) qui n'avaient constaté qu'une modification de la proportion d'octène-1-one-3 lors de la cuisson. En ce qui concerne les chromatogrammes obtenus à partir de champignons cuits, nous n'avons observé qu'une augmentation de l'intensité des pics dans la fraction recueillie en piégeant les vapeurs d'un blanc industriel.

Nous avons déterminé la structure exacte de l'octène-2-ol-1. Le produit de synthèse contient deux alcools qui sont bien séparés par chromatographie en phase gazeuse préparative. Ces deux alcools ont même masse moléculaire 128,

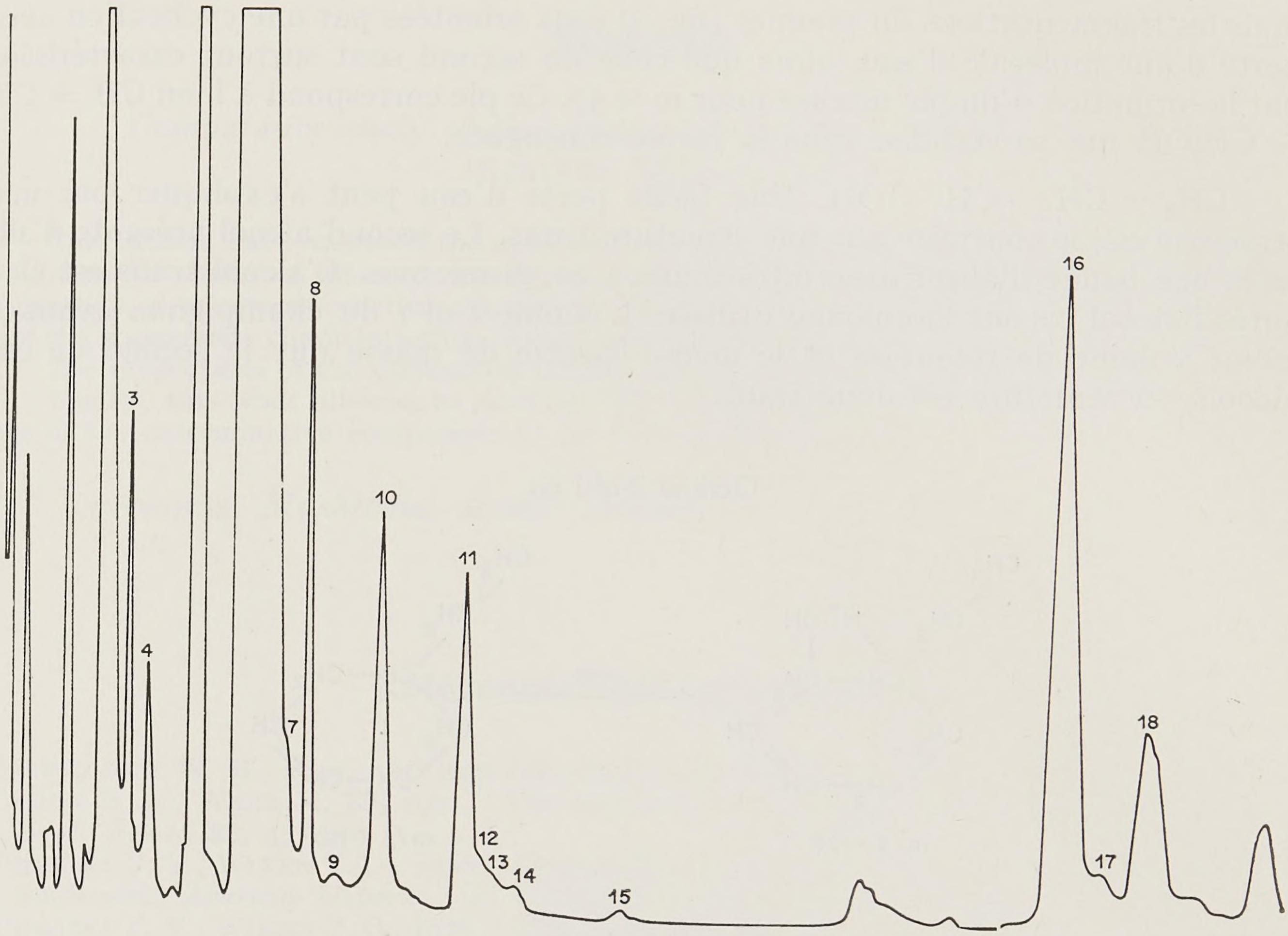


FIG. 2. — *Aromagramme du champignon cuit.*

TABLEAU 2

Composés volatils identifiés

	Champignon cuit	Champignon cru
1	Alcool isoamylique	Alcool isoamylique
2	Octanone-3	Octanone-3
3	Octène-1 ol-3	Octène-1 one-3
4	Hexanol-1	Hexanol-1
5	Octanol-3	Octanol-3
6	Octène-1 ol-3	Octène-1 ol-3
7	Furfural	—
8	Benzayldéhyde	Benzaldéhyde
9	Methylfurfural	—
10	Octanol-1	Octanol-1
11	Octène-2 ol-1	Octène-2 ol-1
12	Phénylacetaldéhyde	Phénylacetaldéhyde
13	Acetophénone	—
(*) 14	Composé inconnu de masse 113	Composé inconnu de masse 113
15	-Terpinéol	-Terpinéol
16	Alcool benzylique	Alcool benzylique
17	Gaïacol	Gaïacol
18	Phényléthanol	Phényléthanol

(*) Ce composé disparaît en même temps que le furfural et le méthylfurfural lorsque l'extrait aromatique est traité par une solution de pH 1 qui élimine également les composés azotés.

mais les fragmentations du premier (fig. 3) sont orientées par une cyclication avec perte d'une molécule d'eau, alors que celle du second sont surtout caractérisées par la formation d'un pic intense pour m /e 57. Ce pic correspond à l'ion CH = CH — CH_2OH qui se stabilise sous la forme conjuguée.

$CH_2 = CH — CH = \overset{+}{O}H$. Une facile perte d'eau peut s'expliquer par une structure cis, le contraire par une structure trans. Le second alcool présente d'ailleurs une bande d'absorption infra-rouge à 10,36 microns. L'alcool trans est élué après l'alcool cis sur la colonne utilisée. L'octène-2-ol-1 du champignon ayant le même volume de rétention et le même spectre de masse que le second de ces alcools, sa structure est donc trans.

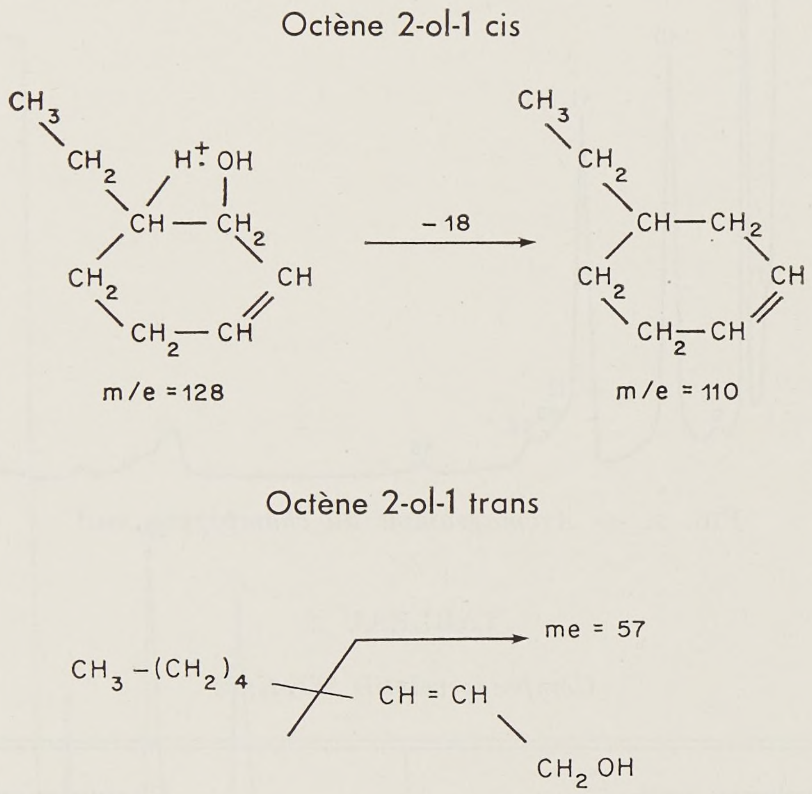


FIG. 3. — *Principales fragmentations des isomères cis et trans de l'octène-2 ol-1.*

Conclusion

Ce travail a permis d'établir la structure de l'octène-2-ol-1 du champignon et de confirmer que l'octanol-3, l'octène-1-ol-3, l'octène-2-ol-1 sont les composés volatils majeurs responsables de l'arôme du champignon cru. De plus, il a été mis en évidence une augmentation des proportions des composés carbonylés : benzaldéhyde, octanone-3, octène-1 one-3 et l'apparition, lors de la cuisson des champignons, de dérivés furanniques. Tous ces composés jouent certainement un rôle important dans la flaveur du champignon cuit.

Si l'arôme du champignon de couche frais paraît particulièrement simple, ses deux composantes principales étant l'octène-1 ol-3 et l'octène-1 one-3, l'arôme du champignon de couche cuit est beaucoup plus complexe et ne peut pas se définir par quelques constituants.

Reçu pour publication en juillet 1977.

Summary

Comparative study of the aroma of raw and cooked mushrooms
(Agaricus bisporus L.)

The authors have analysed the aroma of raw and cooked mushrooms (Agaricus bisporus).

After the study of different organic solvents for the liquid extraction from the liquid, the separation of the aroma constituents was carried out by chromatography in the gaseous phase, and the compounds characterisation was realized by coupling with a mass spectrometer.

The proportions of the carbonyled compounds proved to be increased after cooking.

Finally, this work allowed to establish the trans-structure of the octene 2-01-1, which is one of the determinative compounds of the raw mushroom aroma.

Key-words: *Mushroom, aroma, cooking.*

Références bibliographiques

Bartolodew W. H., 1949. All glass laboratory long tube evaporation. *Anal. Chem.*, **21**, 527.

Cronin D. A., Ward M. K., 1971. The caracterisation of some mushroom volatiles. *J. Sci. Food. Agric.*, **22**, 477-479.

Dijkstra F. Y., Wiken T. O., 1976. Organoleptic significance of constituents of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. *Z. Lebensmittel Untersuch. Forsch.*, **160**, 255-262.

Dijkstra F. Y., Wiken T. O., 1976. Flavour compounds in *Coprinus comatus*. *Z. Lebensmittel Untersuch. Forsch.*, **160**, 263-269.

Likens S. T., Nickerson G. B., 1964. Detection of certain hop oil constituents in brewing products. *Proc. Amer. Soc. Brew. Chem.*, 5-13.

Linstead R. P., Boble E. G., Boorma N. E. J., 1933. Investigations of the olefinic acids. The preparation of B-acids. *J. Chem. Soc.*, 557-561.

Picardi S. M., Issenberg P., 1973. Investigation of some volatile constituents of mushrooms (*Agaricus bisporus*). Change which occur during heating. *J. Agric. Food. Chem.*, **21**, 6, 959-962.

Pyysalo H., 1976. Identification of volatile compounds in seven edible fresh mushrooms. *Acta. Chem. Scand.*, B**30**, 235-244.

Watson J. T., Biemann R., 1965. Direct recording of high resolution mass spectra of gas chromatographie effluents. *Anal. Chem.*, **37**, 844.

Ann. Technol. Agri., 1977, **27** (3), 295-304.

Isolation of positional and geometrical isomers of hydroperoxides and the evaluation of the effects of selected parameters on their ratio [1, 2, 3]

H. E. PATTEE and J. A. SINGLETON

Mid-Atlantic Area, S.R., A.R.S., U.S.D.A. and Departments of Botany and Biological and Agricultural Engineering North Carolina State University, Raleigh, N. C. 27607, U.S.A.

Summary

Hydroperoxides were isolated from the peanut lipoxygenase-linoleic acid reaction mixture and were separated as their methyl esters by high performance liquid chromatography. Mass spectrometry and infrared analyses indicated the isolated hydroperoxides to be 13-hydroperoxy-*cis*-9, *trans*-11-octadecadienoic acid; 13-hydroperoxy-*trans*-9, *trans*-11-octadecadienoic acid; and *trans*, *cis* and a *trans-trans* mixture of 9-hydroperoxy-10, 12-octadecadienoic acids. The percentages of the hydroperoxides were 72.8 p. 100, 3.6 p. 100 and 23.6 p. 100 under the standard reaction. The effect of various conditions on product specificity—the percentages, or ratio, of isomers formed—was also determined. Extraction solvent, extraction temperature, and reaction temperature only slightly affected the isomeric hydroperoxide ratio, but were significantly related to the total amount of hydroperoxides produced and extracted. Oxygen tension and pH markedly affected the distribution of isomeric hydroperoxides as well as the total amounts of hydroperoxides produced. During storage of the hydroperoxides in hexane, temperature, length of storage, and concentration affected the extent to which they isomerized.

Key-words: *Peanut, lipoxygenase, linoleic acid, hydroperoxides isomers, isolation.*

(1) Paper No 5266 of the Journal Series of the North Carolina Agricultural Experiment Station, Raleigh N. C. 27607.

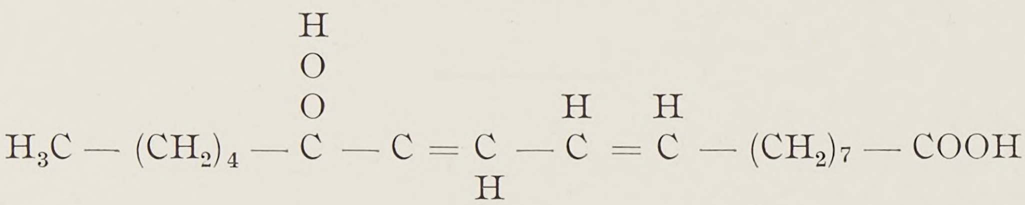
(2) Use of trade names of specific materials does not constitute endorsement by the United States Department of Agriculture to the exclusion of others which may also be available.

(3) Presented at the « Lipases and Lipoxidases from Vegetable Origin » Symposium, 13th World Congress of the International Society for Fat Research, Marseille, France (1976).

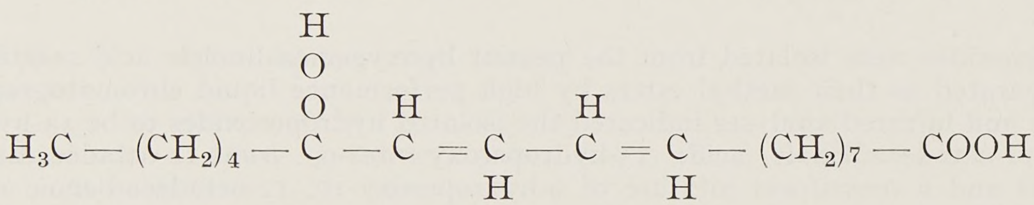
Introduction

The development of high performance liquid chromatography (HPLC) techniques for separating hydroperoxides has facilitated the investigation of the lipoxygenase-linoleic acid reaction (CHAN *et al.* 1975, PATTEE H. E., SINGLETON 1977). The position of the hydroperoxide group on isomeric hydroperoxides formed by the oxidation of linoleic acid, and the ratio in which those positional isomers are formed largely determine the amounts and types of their enzymatic and non-enzymatic degradation products (LEU, 1974; GALLIARD, 1975; GARDNER, 1975). Thus it is important to know the positional isomers produced by the lipoxygenase enzyme being evaluated. Moreover, their identification must be made with the consideration that two geometrical isomers can be produced for each isomer. They are:

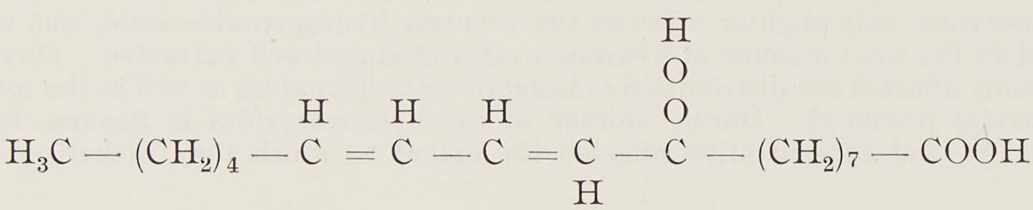
13-hydroperoxy-*cis*-9, *trans*-11-octadecadienoic acid



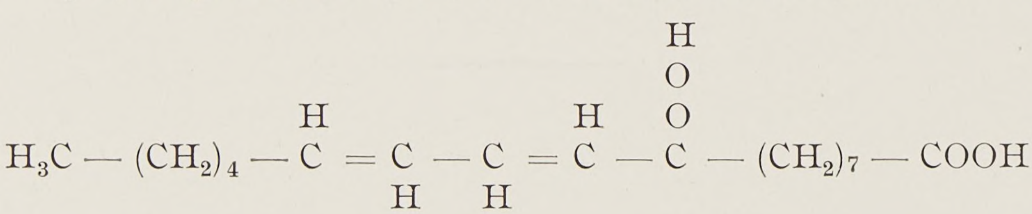
13-hydroperoxy-*trans*-9, *trans*-11-octadecadienoic acid



9-hydroperoxy-*trans*-10, *cis*-12-octadecadienoic acid



9-hydroperoxy-*trans*-10, *trans*-12-octadecadienoic acid



In peanuts products of the lipoxygenase-linoleic acid reaction and of subsequent hydroperoxy-enzymatic reactions are partially responsible for the raw flavor (SINGLETON *et al.*, 1976). Thus, we undertook to identify the positional and geometrical isomers produced by the lipoxygenase reaction and to determine the effects of various parameters on the amounts of each isomer produced.

Experimental procedures

Hydroperoxide Formation

Isomeric hydroperoxides were formed by the incubation of peanut lipoxygenase with linoleic acid (high purity grade III from Sigma Co.) as previously described (PATTEE, SINGLETON, 1977). To determine the effects of reaction conditions on the distribution of hydroperoxides formed, we varied the parameters of our standard conditions one at a time. The standard conditions were aerobic oxidation at 25 ^{0}C and pH 6.2. The variations included limited oxygen supply, reaction temperatures of 0^0 and 37^0, and pH 8.3. For the aerobic reaction oxygen was supplied during the entire reaction period. For limited oxygen supply, the reaction flask was saturated with oxygen, then sealed after enzyme addition. All reactions continued for 30 minutes unless otherwise specified. The conjugated diene content of each reaction was determined spectrometrically at 234 nm in absolute ethanol prior to enzyme addition and after termination of the reaction. Total conjugated diene concentration produced in the reaction mixture was calculated by use of a molar absorptivity value of 25 000.

Extraction and Methylation

The standard extractant for the hydroperoxides was $CHCl_3$: MEOH (2:1) and was compared with 50 p. 100 diethyl ether: petroleum ether (b.p. 60-110^0), and diethyl ether. The reaction mixtures were adjusted to about pH 3 with HCl and extracted 3 times with 200 ml of solvent. The standard extraction temperature was 25 ^{0}C. Extracts were combined, washed 3 times with distilled H_2O, reduced in volume, and the hydroperoxides methylated with diazomethane (SCHLENK; GELLERMAN, 1960). Hydroperoxide methyl esters were purified by silica gel column chromatography (PATTEE; SINGLETON, 1977) and were eluted in the 50 p. 100 ether-hexane fraction.

High Performance Liquid Chromatography

Hydroperoxide methyl esters were separated by HPLC on a 4.6 × 500 mm Partisil 10 column using a Varian Model 8500 liquid chromatograph. Hydroperoxides were detected by monitoring the effluent at 234 nm with a Varian Varichrom detector equipped with 8 μl flow cells. Hexane was used as the eluting solvent, with absolute ethanol (0.26 p. 100) to modify polarity. Solvent flow rate was 4 ml/min. Areas under the 234 nm absorption peaks were integrated with an Autolab System I Computing Integrator, and isomeric distributions calculated.

Spectral Methods

Infrared (IR) spectra were recorded with a Perkin Elmer Model 521 spectrometer. Spectra of isolated compounds were determined as liquid films on CsBr plates.

The mass spectra of the isolated compounds as methyl hydroxystearates were obtained with an AEI Model 902 instrument by direct probe insertion at 130 °C.

Results and discussion

High performance liquid chromatography of the methyl esters of the isolated hydroperoxides separated three major compounds that absorbed at 234 nm (fig. 1). Each component was collected separately, reduced to the corresponding methyl

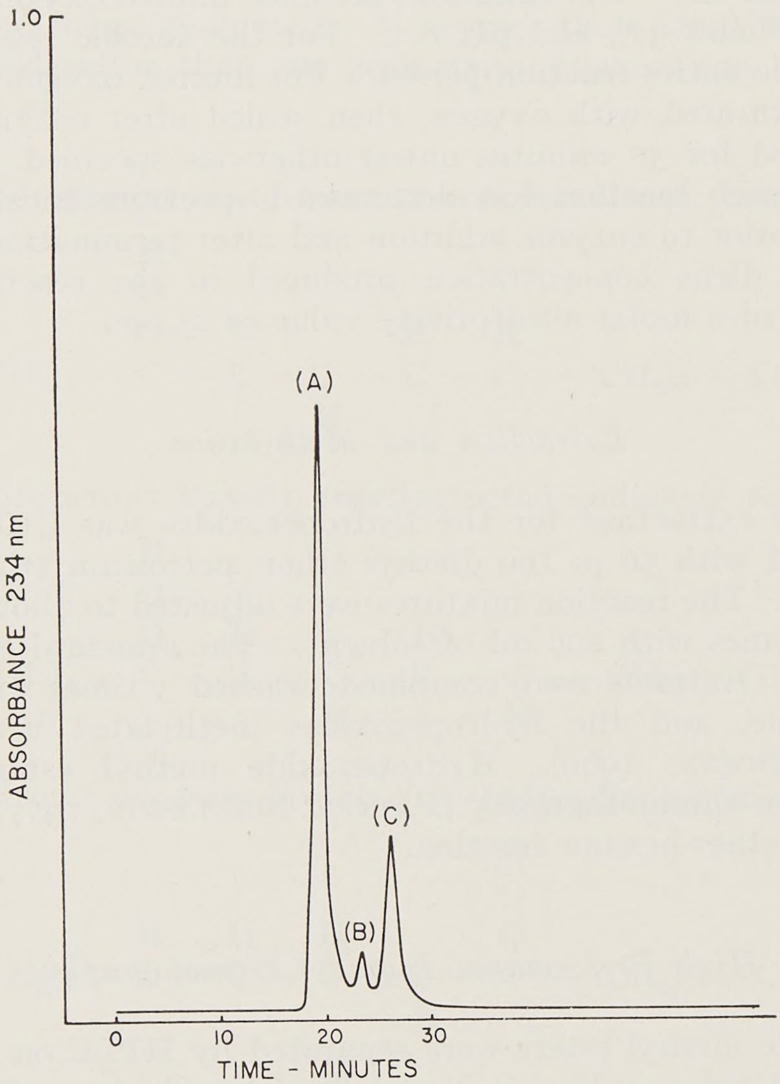


FIG. 1. — *HPLC chromatogram of methyl esters of hydroperoxides A, B, and C produced during the incubation of peanut lipoxygenase with linoleic acids.*

hydroxyoctadecadienoate with $NaBH_4$, and hydrogenated with H_2 and Adams catalyst to yield the methyl hydroxystearate. The hydrogenated esters were then analyzed by gas chromatography on a 1/8 in. × 6 ft. OV-25 column at 210 °C. They were identified as methyl monohydroxystearates by comparison of their retention times with those of knowns and by co-chromatography with knowns.

Mass spectrometry of esterified and reduced A yielded diagnostic mass peaks at 211, 214, and 243, as did the corresponding derivative of B, indicating the hydroxyl group was at the 13-position. The geometrical configuration of these two 13-positional isomers were determined by IR analysis. Absorption bands

in the 900-100 cm^{-1} region can be used to differentiate the *cis, trans* and *trans, trans* geometrical isomers (O'CONNER, 1956). Esterified A had absorption peaks at 943 cm^{-1} and 977 cm^{-1}, thus indicating a *cis, trans* conjugation. Esterified B had a single absorption peak at 986 cm^{-1}, which indicated a *trans, trans* conjugation. Thus A and B were identified as 13-hydroperoxy-*cis*-9, *trans*-11-octadecadienoic (13-LOOH (*cis, trans*)) and 13-hydroperoxy-9, *trans*-11-octadecadienoic acid (13-LOOH (*trans, trans*)), respectively.

Mass spectrometry of derivatized C yielded diagnostic mass peaks at 155, 158, and 187 indicating the hydroxyl group was at the 9-position. IR analysis of esterified C indicated a mixture of *trans-cis* and *trans, trans* isomers. Thus, C was only identified as 13-hydroperoxy-9, 11-octadecadienoic acid (9-LOOH).

Integration of the peak areas showed that 72.8 p. 100 13-LOOH (*cis, trans*), 3.6 p. 100 13-LOOH (*trans, trans*) and 23.6 p. 100 9-LOOH were formed under the standard conditions of reaction and extraction. The distribution of hydroperoxides isolated from lipoxygenase-linoleic acid reactions using different plant preparations and reaction conditions has been widely studied (GALLIARD, 1975). Generally, the assumption has been that both positional isomers, when present, were enzymically produced and that the minor one had a *cis, trans* configuration. The work of Chan and co-workers (CHAN *et al.*, 1977) on thermal stability of hydroperoxides showed that the ratio of the positional isomers could change drastically with storage at an elevated temperature and moderately at reduced temperature storage. Thus, to determine product specificity of lipoxygenase reactions adequate controls of analytical procedures must be maintained to minimize positional and geometrical isomerization. Table 1 shows that the proportion of isomers extracted did not differ significantly with solvent but that the amount of hydroperoxides extracted varied significantly with the solvent. The most polar, ($CHCl_3$:MEOH), was the most efficient extractor of the conjugated diene reaction products.

TABLE 1

Effect of extracting solvent on the percentages of siomeric hydroperoxides (*)

Extraction Solvent	% 13-LOOH *cis, trans*	% 13-LOOH *trans, trans*	% 9-LOOH	Mg LOOH 50 % Ether/H Fract.
$CHCl_3CH_3OH$	70.4 ± 5.0	2.3 ± 0.6	27.3 ± 4.4	42.8 ± 9.0
Ether	72.8 ± 2.9	1.9 ± 0.2	25.7 ± 2.8	33.6 ± 5.7
50 % Ether/Pet. Ether	72.8 ± 5.4	2.1 ± 1.1	25.1 ± 5.4	27.7 ± 4.7

(*) Average of three replications ± S. D.

On the basis of thermal stability studies, CHAN *et al.* (1975), suggested using low temperatures for extraction of lipoxygenase-linoleic acid reaction mixtures. Table 2 shows the effect of extraction temperature on the isomeric distribution of hydroperoxides recovered from the peanut lipoxygenase reaction. The percentage of the 13-LOOH (*cis, trans*) extracted was lower at 25 °C than at 4 °C. However, the quantity of hydroperoxides recovered was significantly higher at 25 °C.

Because of extraction efficiency and convenience, extraction at 25° would seem appropriate.

Hydroperoxides can isomerize at any point during the reaction and product

TABLE 2

Effect of solvent extraction temperature on the percentages of isomeric hydroperoxides (*)

Extraction Temperature	% 13-LOOH *cis, trans*	% 13-LOOH *trans, trans*	% 9-LOOH	Mg LOOH 50 % Ether/H Fract.
4 C	77.4 ± 1.1	1.9 ± 0.6	20.7 ± 0.8	54.8 ± 8.8
25 C	74.6 ± 0.6	1.5 ± 0.3	13.9 ± 0.4	79.4 ± 7.3

(* Average of three replications ± S. D.

isolation periods. Adequate comparisons of different reaction temperatures at a particular pH with regard to hydroperoxide isomer ratio or isomerization effects have not been reported. Table 3 shows that increasing the reaction temperature from 0 °C to 37 °C decreased the formation of 13-LOOH (*cis, trans*) and the amount of hydroperoxides extractable with $CHCl_3$:MEOH. When the oxygen tension

TABLE 3

Effect of reaction temperature on the percentages of isomeric hydroperoxides (*)

Reaction Temperature	% 13-LOOH *cis, trans*	% 13-LOOH *trans, trans*	% 9-LOOH	Mg LOOH 50 % Ether/H Fract.
0 C	82.9 ± 1.7	1.1 ± 0.5	16.0 ± 1.8	87.1 ± 4.0
25 C	80.7 ± 1.3	1.6 ± 0.6	17.7 ± 0.8	83.2 ± 5.6
37 C	77.8 ± 3.4	2.7 ± 0.5	19.5 ± 3.0	62.4 ± 6.1

(*) Average of three replications ± S. D.

TABLE 4

Effect of oxygen tension on the percentages of isomeric hydroperoxides (*)

Oxygen Tension	% 13-LOOH *cis, trans*	% 13-LOOH *trans, trans*	% 9-LOOH	Mg LOOH 50 % Ether/H Fract.
Saturated	74.9 ± 1.5	2.6 ± 0.5	22.5 ± 1.2	41.8 ± 9.8
Limited	42.7 ± 0.5	7.0 ± 1.3	50.3 ± 1.3	18.9 ± 1.5

(*) Average of three replications ± S. D.

of the reaction mixture was reduced (Table 4), not only was the amount of hydroperoxide recovered drastically reduced but the proportion of isomers was significantly changed. Total amounts of hydroperoxides produced under oxygen-limiting conditions were about one-half those produced in the O_2 saturated system. These results agree with changes in the ratio of positional isomers formed by the soybean system (LEU, 1974), when incubated at pH 9 and 6 with 1 p. 100 O_2 vs 100 p. 100 O_2 at 25 °C. On the other hand, LEU and ERIKSSON (1972) found that O_2 tension had essentially no effect on the isomeric ratio of hydroperoxides produced by the reaction of pea lipoxygenase with linoleic acid.

Product specificity of peanut lipoxygenase was affected significantly by the pH of the reaction mixture. The 13-LOOH (*cis, trans*) was predominant at pH 6.2, whereas the ratio of the positional isomers was about 1:1 at pH 8.3 (Table 5). Also, the value for total hydroperoxides was significantly lower at pH 8.3. Our results agree with those of CHRISTOPHER and AXELROD (1971) who reported that the soybean system produced a 1:1 ratio of positional isomers at a neurtral pH; however, they stated that differences in isomeric ratio cannot be explained solely by pH. On the basis of the various parameters tested, we conclude that the distributions of isomeric hydroperoxides are a result of reactions and isomerizations occurring primarily during the reaction and not during product isolation.

TABLE 5

Effect of pH on the percentages of isomeric hydroperoxides (*)

pH	% 13-LOOH *cis, trans*	% 13-LOOH *trans, trans*	% 9-LOOH	Mg LOOH 50 % Ether/H Fract.
6.2	74.9 ± 1.5	2.6 ± 0.5	22.5 ± 1.2	41.8 ± 9.8
8.3	42.2 ± 3.6	10.9 ± 3.6	43.9 ± 5.8	7.7 ± 2.2

(*) Average of three replications ± S. D.

If hydroperoxides are not analyzed immediately after isolation they may undergo chemical isomerization, the extent of which depends on the holding conditions and period. The possible occurrence of chemical isomerization has made determining product specificity of lipoxygenase very difficult. We stored the methyl esters of the hydroperoxides from the peanut lipoxygenase system, at a concentration of 5 mg/ml hexane, at —20 °C, 4 °C, and 25 °C and determined the isomeric distribution at the start of storage and periodically thereafter (fig. 2). At —20 °C there was almost no change in the distribution until after 19 days of storage. When stored at 4 °C, 13-LOOH (*cis, trans*) decreased from 78 p. 100 to 74 p. 100 in one day and to 53 p. 100 in 13 days. The 13-LOOH (*trans, trans*) component increased from 2 p. 100 to 13 p. 100 and the 9-LOOH component from 19 p. 100 to 33 p. 100 after 13 days of storage. The instability of hydroperoxides at 25 °C is seen by the increase in isomerization rate over the other storage temperatures used. The first sampling was made at five hours of storage and it is seen that the 13-LOOH (*cis, trans*) had decreased from 78 p. 100 to 69 p. 100, 13-LOOH (*trans, trans*) had increased from 2 p. 100 to 7 p. 100, and 9-LOOH had increased from 18 p. 100 to 25 p. 100. By 4 days the isomerization reaction began

approaching equilibrium, and by 6 days appeared to be near a steady equilibrium state. The distribution at this point was 9 p. 100 13-LOOH (*cis, trans*), 38 p. 100 13-LOOH (*trans, trans*) and 53 p. 100 9-LOOH. The rate curves suggest that the formation of 13-LOOH (*trans, trans*) and 9-LOOH from 13-LOOH (*cis, trans*) is a random event, with no preference for the formation of either.

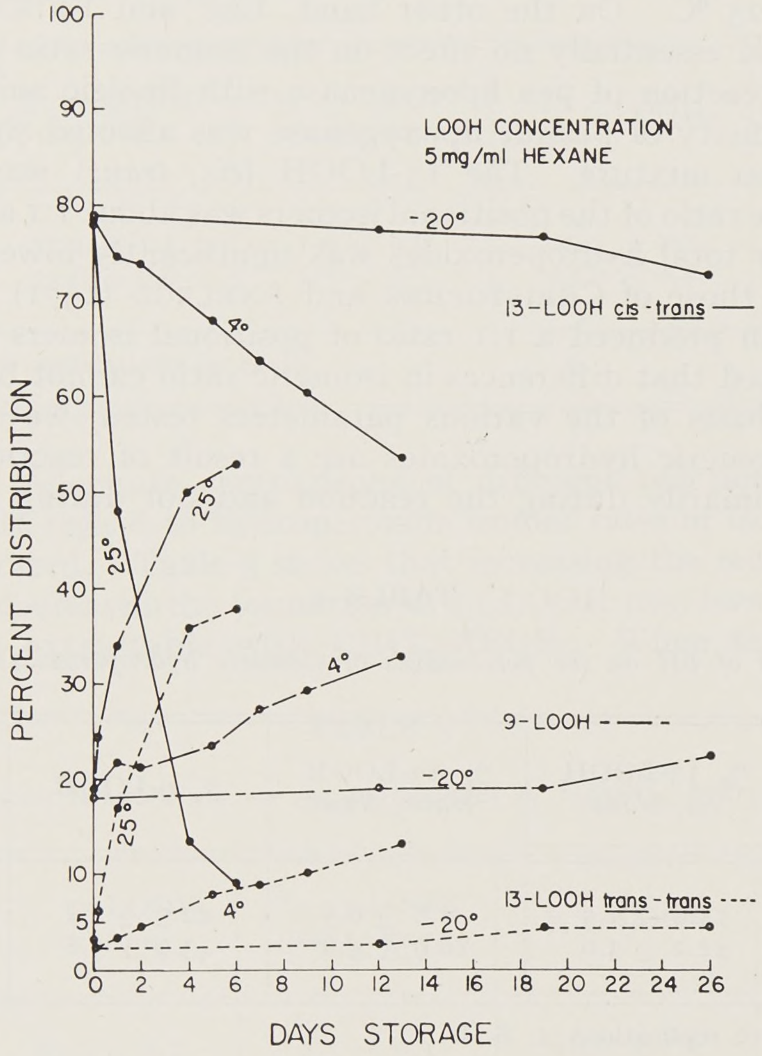


FIG. 2. — *Effect of storage temperature and time on hydroperoxide isomer distribution.*

The effect of concentration on the isomerization reaction is shown in figure 3. Between zero and 24 hours of storage, the rate of isomerization increased with increasing concentration, as would be expected. However, between 24 and 96 hours the rate was lowest for the highest concentration (50 mg/ml). We attributed the low isomerization rate to the separation of the hydroperoxides and solvent that occurred only at that concentration. Thus our conclusion does not agree with the suggestion of CHAN *et al.* (1975), that separation of hydroperoxides and solvent should enhance the rate of isomerization. We insured the absence of gradients by remixing the hydroperoxide and solvent before withdrawing an aliquot for analysis. Convergence of the 13-LOOH (*trans, trans*) and 9-LOOH curves suggests that an equilibrium state should be reached at a 1:1 ratio of the two isomerization products.

We studied the product specificity of peanut lipoxygenase under various environmental conditions and found it to be affected most by oxygen tension and pH. Limited O_2 and alkaline pH shifted the ratio of 13-LOOH and 9-LOOH to about 1:1. Other factors, such as temperature of reaction, extraction tempe-

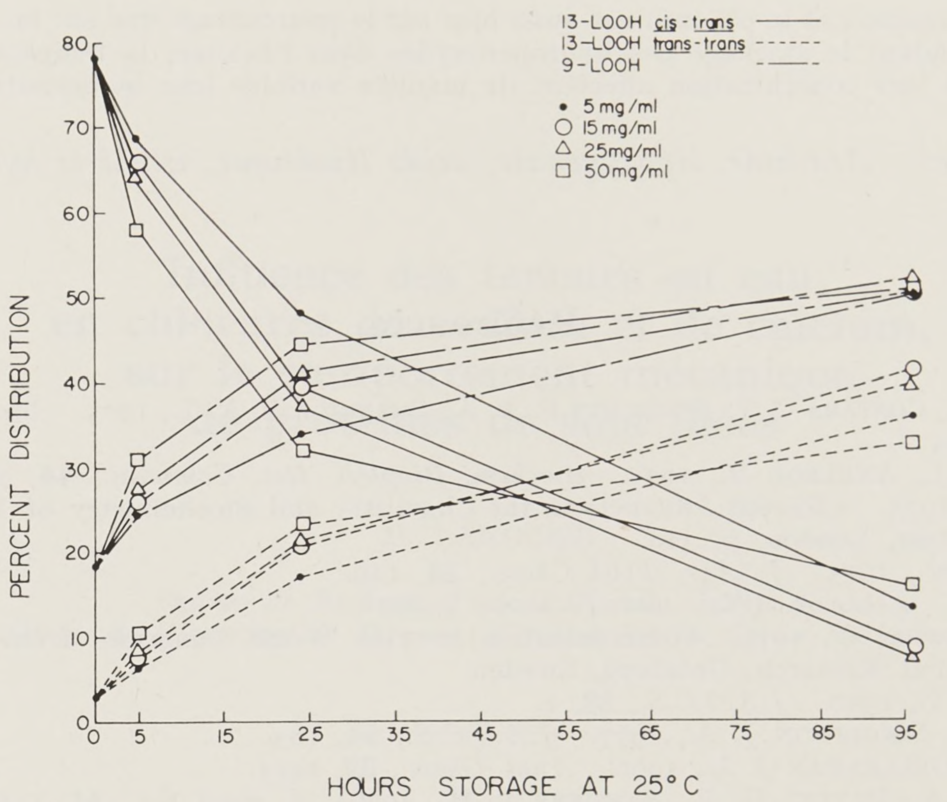


FIG. 3. — *Effect of hydroperoxide concentration and storage time on hydroperoxide isomer distribution.*

rature, and choice of solvent, caused minor shifts in the distribution of isolated isomeric hydroperoxides. With regard to determining product specificity of lipoxygenase, our study shows the importance of and need for standardized methods of work-up, manipulation, and storage of isomeric hydroperoxides. Only under carefully controlled conditions can isomeric specificity of lipoxygenase be determined and reproducible results be obtained.

Reçu pour publication en juillet 1977.

Résumé

Isolement des isomères positionnels et géométriques des hydropéroxydes et effets de certains paramètres sur leur pourcentage de formation

Les hydroperoxydes ont été isolés à partir d'un milieu réactionnel contenant l'acide linoléique et la lipoxygénase de l'arachide et séparés sous forme d'esters méthylés par chromatographie liquide haute pression. Les hydroperoxydes isolés ont été identifiés par spectrométrie de masse et spectrophotométrie infrarouge comme étant les acides 13 hydroperoxy-*cis*-9, *trans*-11-octadécadiénoïque; 13 hydroperoxy-*trans*-9, *trans*-11-octadécadiénoïque et un mélange des formes trans, cis et trans, trans de 9-hydroperoxy-10, 12 octadécadiénoïques. Dans les conditions standard de la réaction, les pourcentages respectifs de ces hydroperoxydes sont 72,8 p. 100, 3,6 p. 100 et 23,6 p. 100. Les effets de diverses conditions sur la spécificité du produit — les pourcentages ou le rapport des isomères formés — ont été étudiés. Le solvant, la température d'extraction et la température de la réaction affectent peu le rapport des isomères formés, mais sont reliés de manière significative à la quantité totale d'hydroperoxydes produits et extraits.

La pression d'oxygène et le pH influent aussi bien sur le pourcentage que sur la quantité totale d'isomères. Pendant le stockage des hydroperoxydes dans l'hexane, la température, la durée du stockage et leur concentration affectent de manière variable leur isomérisation.

Mots clés : *Arachide, lipoxygenase, acide linoléique, isomères hydroperoxides.*

Références

Chan H. W. S., Costara C. T., Prescott F. A. A., Swoboda P. A. T., 1975. *Biochim. Biophys. Acta*, **398**, 347.
Christopher J., Axelrod B., 1971. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **44**, 731.
Galliard T., 1975. « Recent Advances in the Chemistry and Biochemistry of Plant lipids ». Academic Press, London, p. 319.
Gardner J. W., 1975. *J. Agr. Food Chem.*, **23**, 129.
Leu K., 1974. *Lebensm. Wiss. und Technol.*, **7**, 82.
Leu K., Eriksson C., 1972. Communication to 11th World Congress of the International Society for Fat Research, Goteborg, Sweden.
O'Conner R. T., 1956. *J.A.O.C.S.*, **33**, 1.
Pattee H. E., Singleton J. A., 1977. *J.A.O.C.S.*, **54**, 183.
Schlenk H., Gellerman J. L., 1960. *Anal. Chem.*, **32**, 1414.
Singleton J. A., Pattee H. E., Sanders T. H., 1976. *J. Food Sci.*, **41**, 148.

Ann. Technol. Agri., 1977, **27**, (3), 305-315.

Influence des teneurs en eau, en chlorures de sodium et de calcium, sur le comportement mécanique de protéines de soja filées

M. LAROCHE

Station de Recherches sur la Viande, I.N.R.A.
Centre de Recherches de Clermont-Ferrand, Theix, 63110 Beaumont

Résumé

Nous avons étudié, avec les appareils que nous utilisons pour l'évaluation de la tendreté de la viande, les modifications du comportement mécanique de protéines de soja filées entraînées par des variations de teneur en eau et par la présence de chlorures de sodium et de calcium.

Les paramètres mécaniques obtenus en cisaillement et en écrasement pour les différents échantillons sont bien correlés. La diminution de la teneur en eau obtenue par séchage entraîne une augmentation de la résistance mécanique. La présence de sels modifie la teneur en eau du produit. Les conséquences sur les propriétés mécaniques dépendent du cation utilisé. La teneur en eau augmente et la résistance diminue lorsque la teneur en ions Cl^- augmente jusqu'à environ 20 mg par gramme de produit. Pour des concentrations plus élevées, la teneur en eau diminue et la résistance diminue faiblement avec le chlorure de calcium alors qu'elle augmente fortement avec le chlorure de sodium. Cette augmentation est obtenue pour des teneurs en sel supérieures à celles rencontrées habituellement dans les produits carnés.

Mots clés : *Soja, protéines filées, comportement mécanique, influence eau, sodium, calcium.*

Introduction

Les protéines végétales commencent à être utilisées dans l'alimentation humaine et l'on peut penser que leur importance augmentera dans les années à venir (LEFEBVRE, 1971; LACOURT, 1973; CULIOLI, 1975). Elles peuvent avoir des origines différentes et se présenter sous diverses formes. Parmi celles ci, la forme filée peut permettre la fabrication de produits nouveaux d'origine exclusivement végétale ou d'« analogues ». Certaines firmes américaines ont déjà élaboré de tels produits, mais leur mode de préparation est généralement maintenu secret.

Dans le cadre d'une action concertée de la D.G.R.S.T. entre plusieurs laboratoires de l'I.N.R.A. et la Société Rhône-Poulenc, nous étudions les propriétés mécaniques de protéines végétales filées en les comparant à celles de la viande. Si les méthodes instrumentales pour l'étude de la texture de la viande sont nombreuses (SZCZESNIAK et TORGESON, 1965), leur utilisation dans les cas de fibres de protéines végétales est restée jusqu'à présent très limitée (STANLAY *et al.*, 1972, AGUILVERA *et al*, 1975, MILLER et MORROW 1975, LAROCHE et SALE 1976).

En effet, tant que les protéines végétales sont utilisées en substitution, leur texture a peu d'influence sur les caractéristiques organoleptiques du produit, mais lorsqu'elles seront utilisées isolément, leur « tendreté » sera très importante.

Pour beaucoup de produits, le comportement mécanique dépend de la teneur en eau. Dans le cas de fibres, il faut distinguer l'eau extérieure, qui agit sur leurs interrelations, de l'eau effectivement liée aux protéines qui conditionne la résistance propre des fibres.

Nous avons étudié, dans le cas de fibres obtenues à partir de protéines de soja, les modifications des propriétés mécaniques induites par des variations de teneur en eau, obtenues par séchage ou par l'action de chlorure de sodium et de calcium.

En effet l'élaboration d'un aliment à partir de fibres protéiques nécessitera une transformation qui modifiera probablement les propriétés des fibres de départ. Il est donc nécessaire, pour la conception de tels produits, de connaître les propriétés mécaniques des fibres et les modifications que peuvent entraîner la préparation des aliments, le séchage et la présence de chlorure de sodium, par exemple, pour les « analogues » des produits de charcuterie.

I. — Matériels et méthodes

1. — *Protéines végétales*

Les fibres utilisées ont été préparées à partir de Promine D du commerce, le filage a été effectué par la Société Rhône-Poulenc (Centre de Recherches des Carrières, 69-St-Fons) dans une filière de 747 trous de 0,15 mm de diamètre. A la sortie du banc de filage, les fils, qui ont un diamètre d'environ 0,1 mm, sont rassemblés en une « mèche » qui se présente sous la forme d'un ruban d'environ 7 à 10 mm de large et de 1 mm d'épaisseur.

Des groupes de 12 mèches de la longueur nécessaire aux essais ont été placés dans des sacs de polyéthylène scellés sous vide et conservés à + 2 °C jusqu'à leur utilisation. Dans de telles conditions (CHIANG et STERNBERG, 1974) les propriétés chimiques des fibres ne sont pas modifiées jusqu'à 2 mois de stockage et des expériences antérieures nous avaient montré qu'il en était de même pour les propriétés mécaniques. Nos expériences ayant été effectuées pendant le mois suivant le filage nous n'avons pas eu à envisager les conséquences d'un vieillissement éventuel des fibres.

2. — *Variation de la teneur en eau*

La teneur en eau initiale des fibres était d'environ 65 p. 100. Dans la viande crue elle varie entre 74 et 78 p. 100 et après cuisson elle peut être légèrement inférieure à 60 p. 100 (LAROCHE, 1977). Nous avons cherché à modifier la quantité

d'eau présente dans les mèches par les immersions dans de l'eau distillée suivies d'essorage dans une essoreuse ménagère dont nous pouvions régler la vitesse de rotation. Nous avons également utilisé pour diminuer la quantité d'eau, le séchage à l'air ambiant. La teneur en eau était déterminée *à posteriori* par la mesure de la matière sèche après 48 heures à 105 °C.

3. — *Chlorures*

L'influence des chlorures de sodium et de calcium a été étudiée par immersion dans des solutions à différentes concentrations dans lesquelles les fibres représentaient environ 15 p. 100 du volume total. Le temps d'immersion était de 24 heures. Les faisceaux de fibres étaient ensuite essorés dans des conditions standard (350 g pendant 3 min).

C'est en effet dans ces conditions qu'il est possible d'obtenir la meilleure répétabilité de teneur en eau des mèches (LACOURT, 1976). Nous pouvons alors considérer que la quantité d'eau « extérieure » aux fibres est identique pour tous les échantillons. La détermination de la concentration en ions Cl^- a été effectuée avec un chlor-O-counter par dosage coulométrique avec précipitation de chlorure d'argent, sur le produit après essorage et sur la solution résiduelle. Avec des solutions de chlorure de sodium, la précision du dosage est supérieure à 2 p. 100.

Dans le cas des solutions de chlorure de calcium, la détermination de la concentration en ions Cl^- est beaucoup moins précise, les dosages sur une même solution donnent des résultats relativement dispersés (15 à 20 %), ce qui peut avoir pour origine une action des ions calcium sur les électrodes utilisées. Pour cette raison, l'étude de la vitesse de pénétration des ions Cl^- a été étudiée uniquement avec des solutions de chlorure de sodium. Pour chaque échantillon la matière sèche a été déterminée.

4. — *Mesures mécaniques*

Les fibres végétales pouvant être utilisées pour l'élaboration d'AVIV (aliments végétaux imitant la viande), nous avons effectué des tests de cisaillement et d'écrasement avec les appareils que nous utilisons pour évaluer la tendreté de la viande (SALE, TOURAILLE, 1973; LAROCHE, SALE, 1976).

II. — Résultats et discussion

1. — *Caractérisation des paramètres mécaniques*

Les paramètres mécaniques permettant de caractériser les fibres mécaniques de protéines végétales définis par LAROCHE et SALE (1976) doivent être brièvement rappelés.

En cisaillement, l'étude de la variation de la force maximale en fonction de

l'épaisseur initiale (fig. 1) a permis de définir le module de résistance au cisaillement :

$g = F_M / e_0 L$ F_M : force maximale de cisaillement,
e_0 : épaisseur initiale de l'échantillon,
L : largeur de cisaillement (10 mm)

et le seuil de cisaillement plastique F* (fig. 1). Ces deux grandeurs peuvent être reliées pour définir l'épaisseur critique $e_0 = F^* / g$.

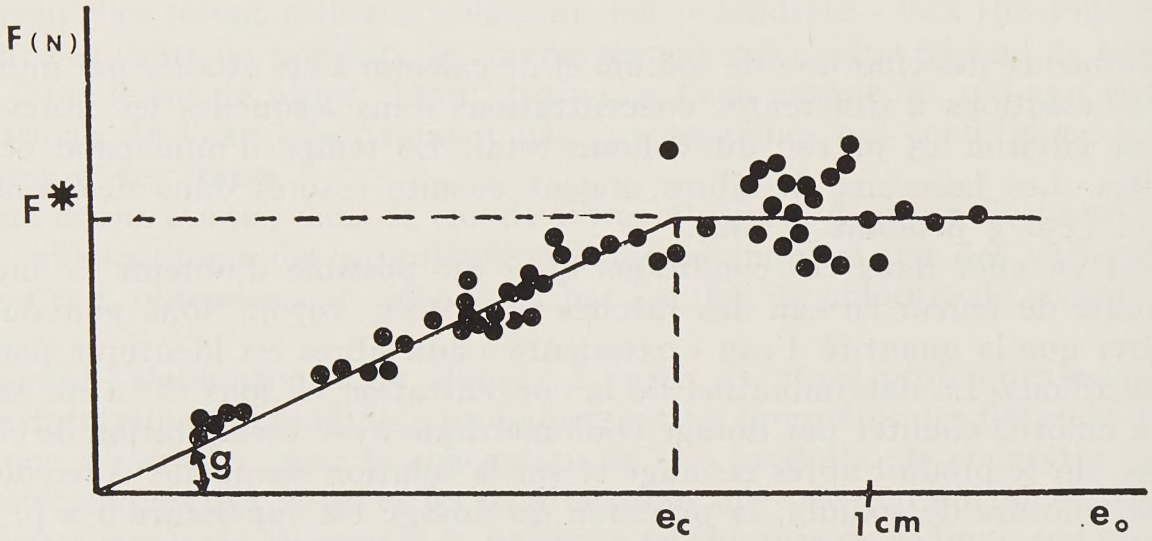


FIG. 1. — *Influence de l'épaisseur initiale de l'échantillon sur la force maximale de cisaillement.*

F : Seuil de cisaillement plastique.
g : Module de résistance.
e_c : Épaisseur critique.

En écrasement, le dispositif de mesure nous permet d'enregistrer la valeur de la force à des taux de déformation $\varepsilon = e / e_0$ fixés et la valeur du seuil de rupture en écrasement S (fig. 2). La représentation des diagrammes types, en déformation rationnelle nous permet de définir le module de résistance à l'écrasement :

$$\alpha = 1 / A \times dF / d(-Ln\,\varepsilon) \quad (A = \text{surface du poinçon})$$

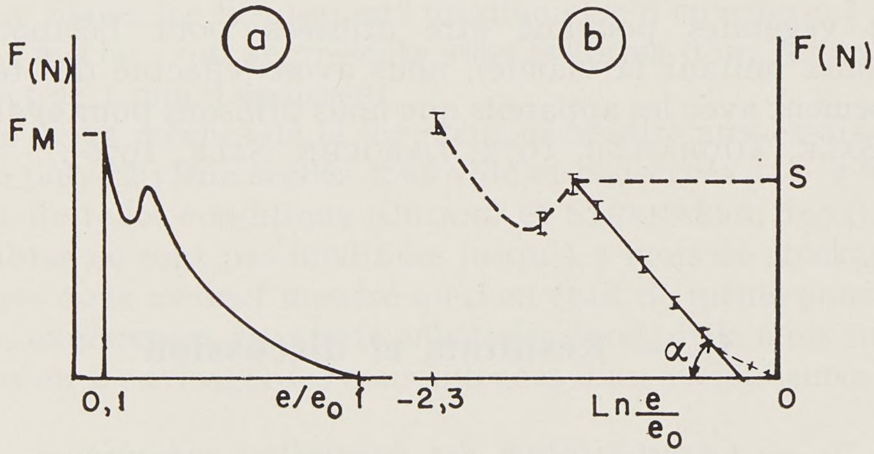


FIG. 2. — *Diagrammes d'écrasement.*

a : Diagramme réel.
b : Diagramme type en déformation rationnelle.
F_M : Force maximale.
S : Seuil de rupture.
α : Module de résistance.

Le seuil de rupture et le module de résistance peuvent être reliés pour définir l'indice de malléabilité $\varepsilon^* = e^{-S/\alpha}$.

Dans cette série d'expériences, les valeurs obtenues pour les principaux paramètres ont varié dans un rapport de 1 à 3. En comparant les valeurs respectives dans chaque série, il est possible de mettre en évidence des relations entre les paramètres obtenus en cisaillement et en écrasement, ainsi qu'entre les 2 appareils (tab. 1 et fig. 3). Ce résultat était prévisible compte tenu de l'homogénéité statistique longitudinale des produits étudiés.

TABLEAU 1

Coefficients de corrélation pour une régression linéaire entre les différents paramètres. Les calculs ont été effectués à partir de 42 séries de valeurs. Seuil de signification à 1 p. 100 : 0,39. Les valeurs non significatives sont indiquées entre parenthèses.

	F^*	W	S	α	ε^*	F_M	F_{20}	F_{40}	F_{60}
g	0,91	0,89	0,92	0,89	0,43	0,91	0,71	0,75	0,88
F^*. . . .	—	0,94	0,98	0,92	0,55	0,93	0,67	0,68	0,88
W. . . .		—	0,93	0,83	0,61	0,92	0,64	0,67	0,82
S			—	0,94	0,53	0,95	0,70	0,73	0,92
α				—	(0,24)	0,86	0,79	0,80	0,98
ε^*. . . .					—	0,54	(0,07)	(0,09)	(0,21)
F_M. . . .						—	0,54	0,60	0,83
F_{20}. . . .							—	0,97	0,86
F_{40}. . . .								—	0,88

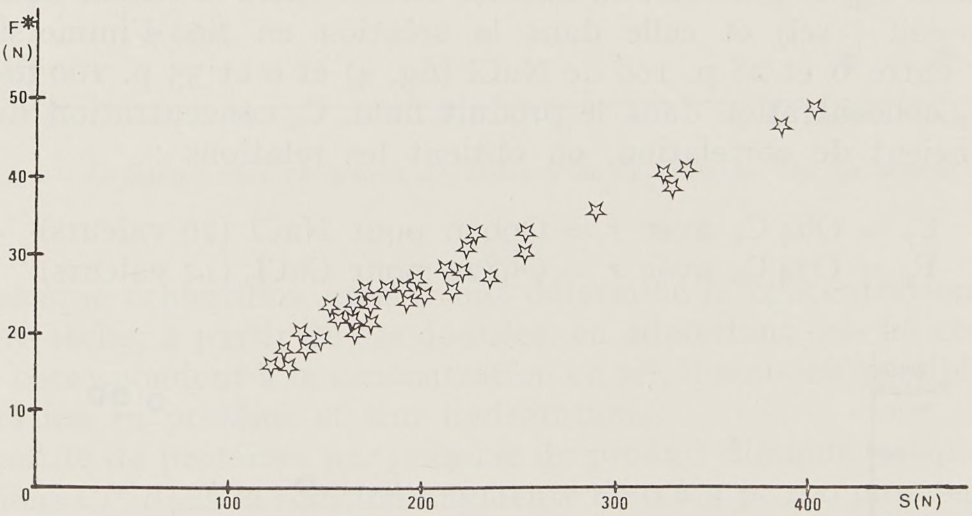


FIG. 3. — *Relation entre le seuil de rupture en écrasement* S *et le seuil de cisaillement plastique* F*.

La valeur du seuil de rupture en écrasement S est bien reliée à tous les paramètres de cisaillement et aux autres paramètres d'écrasement, sauf à l'indice de malléabilité et aux forces à 20 et 40 p. 100 de déformation. La force due au réarrangement des fibres les unes par rapport aux autres est importante relativement à la force propre de compression dans la phase initiale du test et devient négligeable ensuite, ce qui peut expliquer que les forces à 20 et 40 p. 100 de déformation sont bien reliées entre elles et moins bien aux autres paramètres considérés.

Il est possible que le peu de relation entre ε^* et les autres paramètres aient

pour origine le manque de précision dans la détermination graphique de α intervenant dans l'exponentielle nécessaire au calcul de ce paramètre. Il apparaît que le seuil de rupture en écrasement S suffit pour comparer entre eux les différents essais, et nous n'indiquerons donc maintenant que les valeurs de ce paramètre pour caractériser les propriétés mécaniques d'un échantillon.

2. — *Variation de la teneur en eau par des méthodes physiques*

La variation de la teneur en eau obtenue par immersion-essorage a été limitée entre 61 et 74 p. 100. En ce qui concerne le séchage, le coefficient de transfert de l'eau entre les fibres et l'air ambiant n'a pas été étudié. Il est possible d'obtenir des teneurs en eau comprises entre 65 (teneur initiale) et 7 p. 100 (équilibre avec l'air ambiant). Cependant le séchage rend les fibres cassantes et difficilement manipulables, ce qui fait que nous n'avons pas pu effectuer les tests mécaniques sur des produits contenant moins de 43 p. 100 d'eau.

3. — *Action des sels sur les caractéristiques du produit*

Pour des temps d'immersion compris entre 1/4 d'heure et 24 heures, la quantité de sel par gramme de produit reste constante, mais la teneur en eau ne se stabilise qu'après 8 à 12 heures d'immersion. Nous avons effectué les mesures après 24 heures dans la solution, dans ces conditions nous étions assurés que le produit était en équilibre.

Nous avons étudié le coefficient de partage des ions Cl^- entre la solution et le produit final. Il existe une relation linéaire étroite entre la teneur dans le produit (protéines + eau + sel) et celle dans la solution en fin d'immersion, celle-ci ayant varié entre 0 et 28 p. 100 de NaCl (fig. 4) et 0 et 35 p. 100 de $CaCl_2$.

Avec C_F concentration dans le produit final, C_S concentration dans la solution, r coefficient de corrélation, on obtient les relations :

$$C_F = 064\ C_S \text{ avec } r = 09979 \text{ pour NaCl (26 valeurs)}$$
$$F_F = 074\ C_S \text{ avec } r = 09824 \text{ pour } CaCl_2 \text{ (12 valeurs)}$$

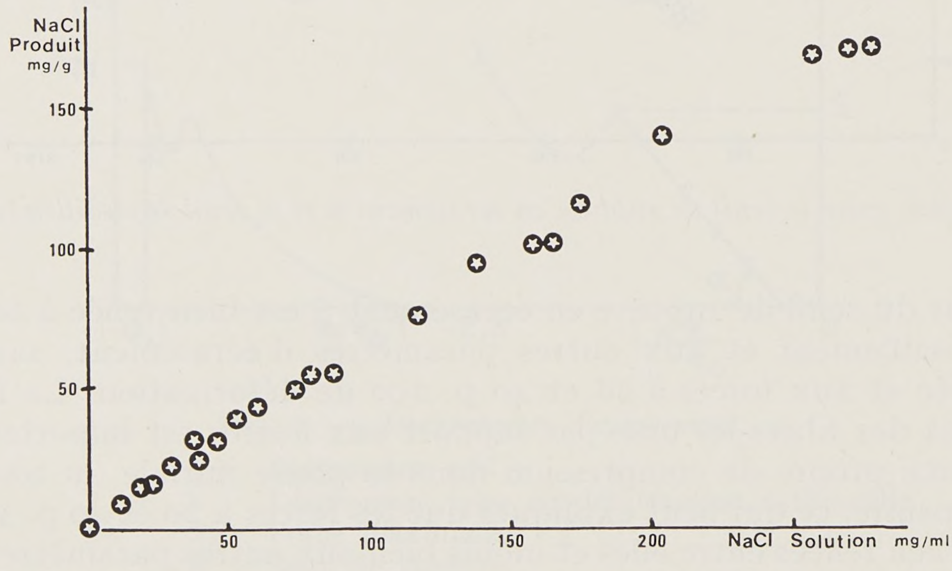


FIG. 4. — *Équilibre des concentrations en chlorure de sodium entre le produit et la solution.*

Si nous comparons le poids P*i* des mèches ayant été soumises à l'essorage « standard » avant d'être immergé dans la solution saline au poids P*f* des mêmes fibres après immersion puis essorage standard, nous constatons que le rapport P*f*/P*i* augmente de 0.94 à 1.08 pour des concentrations en ions Cl^- dans la solution augmentant de 0 à 3 p. 100 puis reste constant ensuite. Ces variations peuvent avoir différentes origines :

fixation du sel,
variation de la quantité d'eau,
solubilisation de protéines,
pertes de fragments de fils au cours des manipulations. Les deux derniers points n'ont pas été pris en compte.

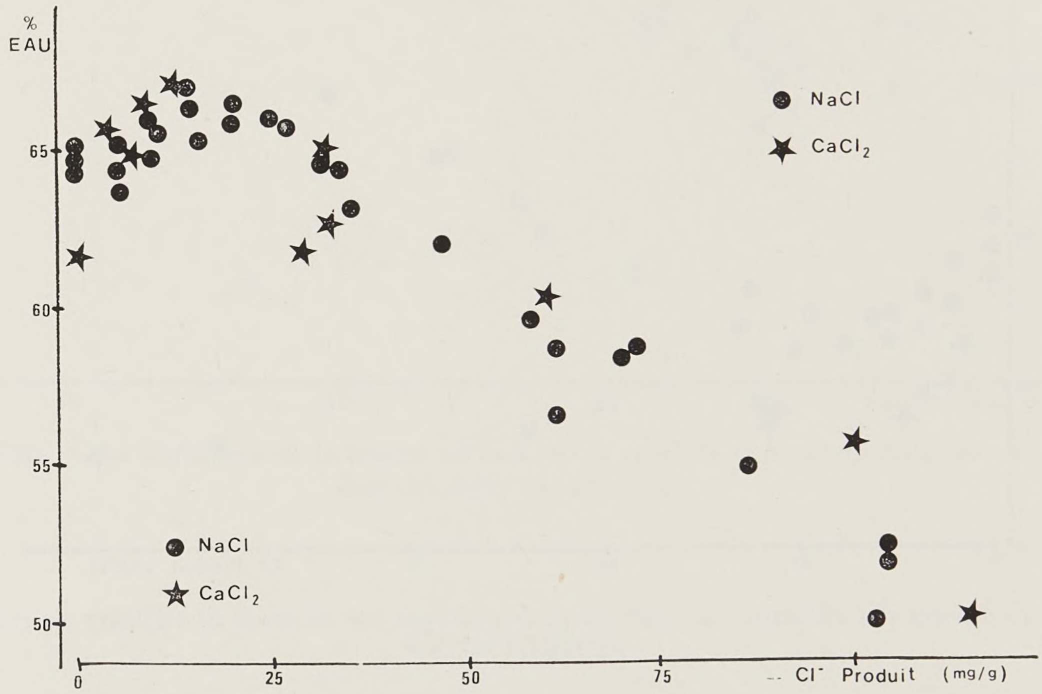


FIG. 5. — *Influence des chlorures de sodium et de calcium sur la teneur en eau.*

Pour chaque échantillon nous avons déterminé la concentration en ions Cl^- et la matière sèche; à partir de ces données, en admettant que les concentrations en ions Cl^- correspondent à la concentration en sel, il nous est possible de calculer la concentration en protéine et leur hydratation.

La quantité de protéines par gramme de produit diminue lorsque la concentration en ions Cl^- dans la solution augmente de 0 à 3 p. 100 puis reste pratiquement constante ensuite. En ce qui concerne l'hydratation des protéines (pourcentage d'eau dans le produit calculé en faisant abstraction du sel) elle augmente de 65 à 69 p. 100 lorsque la concentration en ions Cl^- augmente jusqu'à 3 p. 100 dans la solution, puis elle diminue ensuite jusqu'à 63 p. 100. La teneur globale en eau dans le produit varie de façon analogue mais avec des amplitudes différentes, augmentation de 65 à 67 p. 100 puis diminution jusqu'à 52 p. 100 (fig. 5).

Si l'on considère la teneur en eau E du produit, sa teneur en sel C_F et la teneur en sel C_S de la solution en équilibre, on obtient dans tous les cas $C_S > C_F \times E$. Une partie du sel contenu dans le produit final est donc nécessairement fixée aux protéines.

4. — *Conséquences sur les paramètres mécaniques*

Les valeurs du seuil de rupture en écrasement sont indiquées en fonction de la concentration en ions Cl^- pour chaque sel sur la figure 6.

Dans les deux cas on observe une diminution importante de la résistance pour des concentrations en ions Cl^- augmentant jusqu'à environ 2 p. 100 dans le produit. Ceci correspond à l'augmentation de la teneur en eau. Pour des concentrations en sel supérieures, le chlorure de calcium entraîne encore une légère diminution de la résistance. Le chlorure de sodium est, par contre à l'origine d'une augmentation importante de la valeur des paramètres mécaniques.

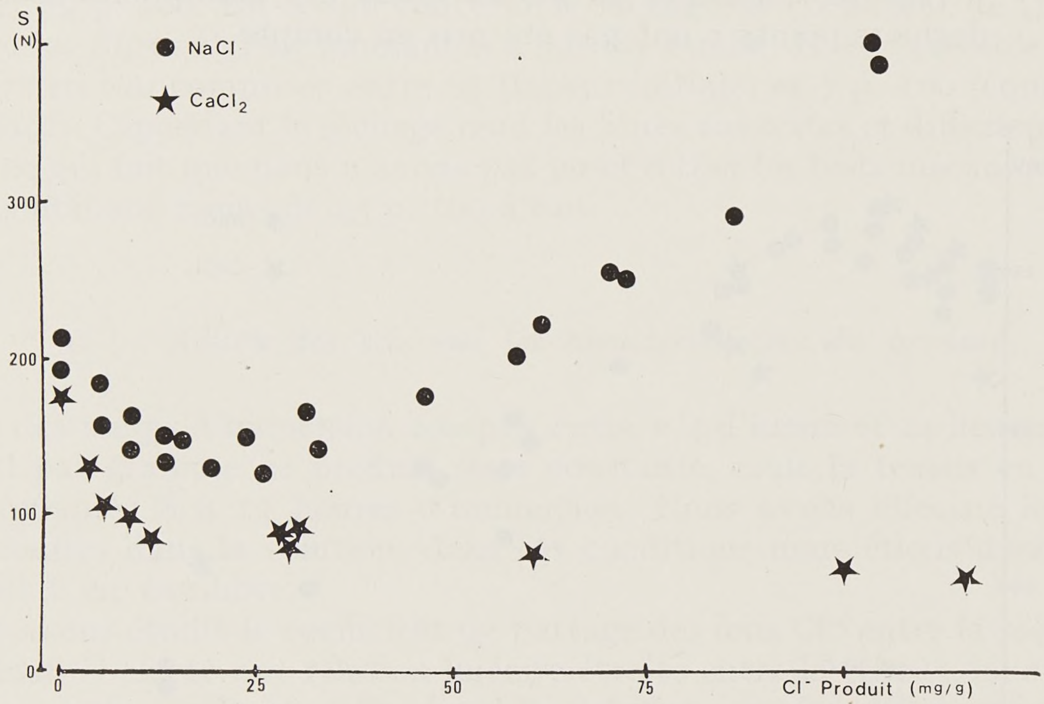


FIG. 6. — *Influence des chlorures de sodium et de calcium sur le seuil de rupture en écrasement.*

La figure 7 reprend, pour l'ensemble des traitements utilisés, les valeurs du seuil de rupture en écrasement S en fonction de la teneur en eau du produit. Dans le cas des fibres traitées par des solutions salines, il s'agit du pourcentage d'eau par rapport à l'ensemble protéines plus sel. Pour des teneurs en eau voisines de 65 p. 100, teneur initiale des fibres, les valeurs de la résistance mécanique sont très dispersées. L'influence de chaque traitement apparaît pour des teneurs en eau plus faibles.

En ce qui concerne la variation de la teneur en eau par des méthodes physiques nous observons que lorsque la quantité d'eau augmente, la valeur de la résistance diminue. L'augmentation observée au cours du séchage peut avoir pour origine la modification de la structure des fibres entraînée par le départ de l'eau. A l'intérieur des mèches, une certaine quantité d'eau doit entourer les fibres et favoriser leur glissement relatif lors des mesures mécaniques. Il est probable que cette eau soit la première perdue par séchage, les déplacements relatifs des fibres deviennent alors plus difficiles, ce qui peut également être à l'origine de l'augmentation de la résistance.

Si avec le chlorure de sodium nous obtenons une variation analogue à celle obtenue par séchage, il n'en est pas de même avec le chlorure de calcium.

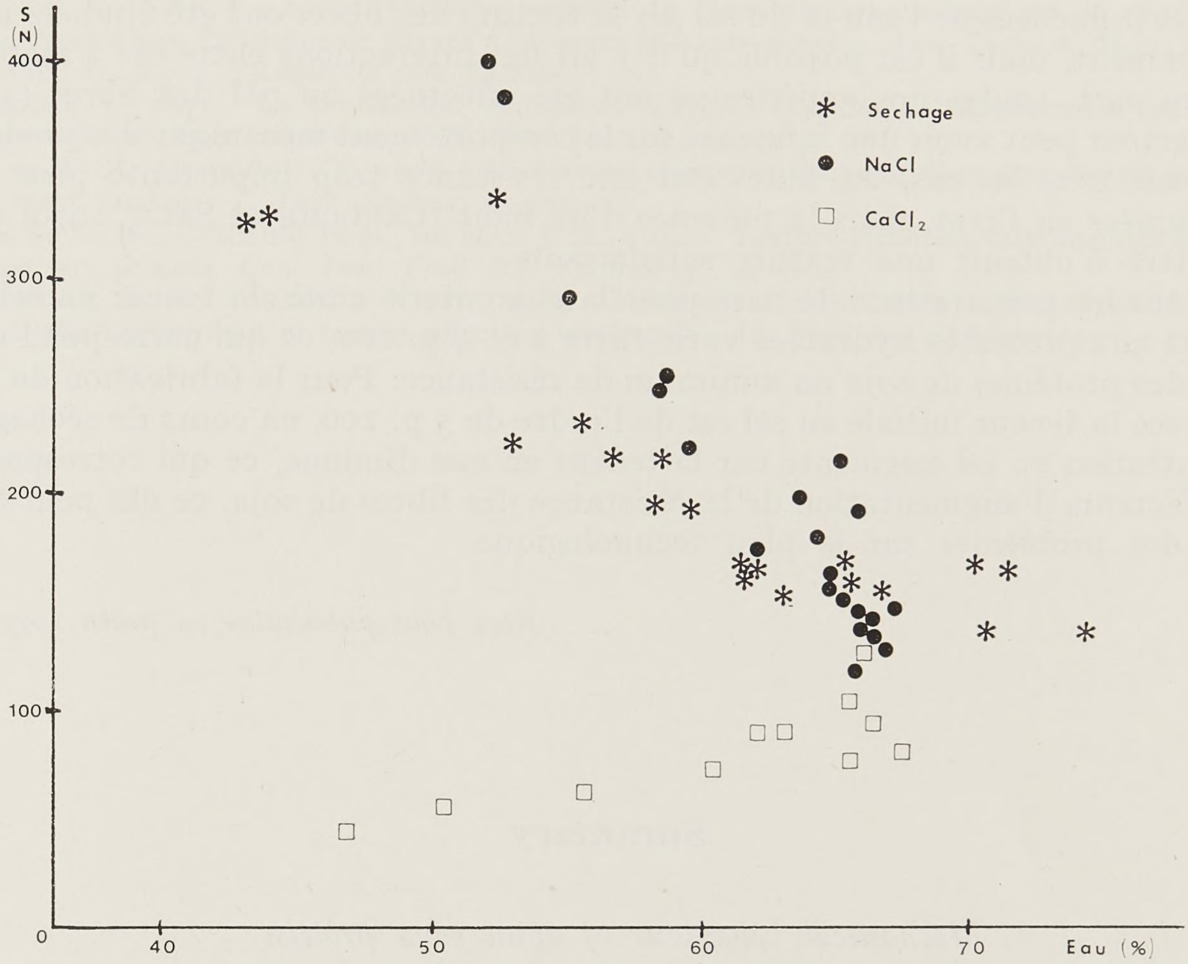


FIG. 7. — *Influence de la teneur en eau sur le seuil de rupture en écrasement dans les trois cas étudiés.*

Conclusion

Nous avons montré que la teneur en eau et en sels des fibres de protéines de soja filées avait une influence importante sur leur comportement mécanique, l'influence des sels utilisés dépendant de la nature du cation.

Ces expériences ont été effectuées sur un seul lot de fibres, et il est possible que l'on obtienne des résultats différents si les conditions de filage sont modifiées. En ce qui concerne le séchage, nous avons observé des modifications irréversibles de la structure des fibres. En effet, quelques essais de réhydratation ont été effectués sur des fibres séchées jusqu'à 37 p. 100 de leur poids initial, séchage qui correspond à l'équilibre avec l'air ambiant. La teneur en eau du produit obtenu ainsi est d'environ 7 p. 100, il a donc perdu 95 p. 100 de l'eau qu'il contenait initialement. La teneur en eau de ces fibres après des immersions dans de l'eau distillée dont la durée a varié entre 2 et 24 heures, a été dans tous les cas de l'ordre de 50 p. 100, le poids final est dans ce cas les 2/3 environ du poids du produit initial. Des séchages poussés modifient donc de façon irréversible certaines structures de la fibre.

En ce qui concerne l'action des sels, nous n'avons pas étudié la réversibilité des traitements. Les différences entre les deux sels utilisés peuvent avoir pour origine des différences de coefficient d'ionisation ou encore de rayon de solvatation des ions mais nous ne disposons d'aucun élément concret pour expliquer les variations observées.

Les influences de l'eau et du sel sur la texture des fibres ont été étudiées indépendamment, mais il est possible qu'il y ait des interactions entre ces 2 facteurs. D'autre part, toutes nos expériences ont été effectuées au pH des fibres (4, 5), et ce facteur peut avoir une influence sur le comportement mécanique des produits.

Dans tous les cas, les fibres ont une résistance trop importante pour être consommées en l'état, mais la présence d'un liant (LAROCHE et SALE, 1976) peut permettre d'obtenir une texture satisfaisante.

Dans les préparations de base pour la charcuterie cuite, la teneur en sel par rapport aux protéines hydratées varie entre 2 et 4 p. 100, ce qui correspond dans le cas des protéines de soja au minimum de résistance. Pour la fabrication du saucisson sec la teneur initiale en sel est de l'ordre de 5 p. 100, en cours de séchage la concentration en sel augmente car la teneur en eau diminue, ce qui correspond à deux facteurs d'augmentation de la résistance des fibres de soja, ce qui peut donc poser des problèmes sur le plan technologique.

Reçu pour publication en juillet 1977.

Summary

Mechanical behaviour of spun soya protein:
effect of water, sodium and calcium chloride

Mechanical properties of fibers spun from Promine D were measured with the same test of shearing and crushing we use on meat.

With this material, similar results are obtained with the two tests.

When the water content decreases by drying, the mechanical strengh increases.

The water content of the product is modified by mineral salts. Changes in mechanical properies are depending on the cation. When the amount of Cl^- increases until 20 mg/g, the water content increases too and the strengh decreases. With higher concentration in Cl^-, water content decreases but the strengh decreases slightly with $CaCl_2$ when increases strongly with NaCl. However this increase occurs with salt contents higher than these commonly used in meat products.

Key-words : *Soya, spun soya protein, mechanical behaviour, effect-water-sodium calcium.*

Références bibliographiques

AGUILERA J. M., KOSIKOWSKI F. V., HOOD L. F., 1975. Ultrastructure of soy protein fibers fractured by various texture measuring devices. *J. Texture Studies*, **6**, 549-554.

CHIANG J. P. C., STERNBERG M., 1974. Physical and chemical changes in spun soy protein fibers during storage. *Cereal Chem.*, **51**, 465-471.

CULIOLI J., 1975. La technologie de préparation des protéines végétales. *Ind. Alimentaire Animal*, **3**, 37-49.

LACOURT A., 1973. Soy proteins in french products with a meat base. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **51**, 191-192.

LACOURT A., 1976. Communication personnelle.

LAROCHE M., SALE P., 1976. Quelques aspects du comportement mécanique de protéines de tournesol filées. Influence de divers adjuvants et liants simples. *Ann. Technol.*, **25** (2),143-158.
LAROCHE M., 1977. Résultats non publiés.
LEFEBVRE J., 1971. La production d'aliments texturés destinés à l'alimentation humaine à partir de protéines végétales. *Cah. Nut. Diet.*, **5** (4), 45-55.
MILLER W. M., MORROW C. T., 1975. Mechanical characterization of fibrous materials as related to meat analogs. *J. Text. Studies*, **6**, 473-487.
STANLEY D. W., CUMMING D. B., DE MAN J. M., 1972. Texture structure relationships in texturized soy protein. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, **5**, 118.
SZCZESNIAK A. S., TORGESON K. W., 1965. Methods of meat texture measurement viewed from the background of factors affecting tenderness. *Ad. Food Res.*, **14**, 33-165.

Communications présentées
au III^{e} Symposium International I.U.P.A.C.
sur les mycotoxines dans l'alimentation
Paris 16-18 septembre 1976

Communications presented
at the third International I.U.P.A.C. Symposium
about mycotoxines in alimentation
Paris, September 16-18 1976

Ann. Technol. agri., 1977, **27** (3), 319-330.

Protection des fourrages ensilés contre la spoliation fongique (*)

J. PELHATE

Faculté des Sciences, Laboratoire d'Agrobiologie
29283 Brest Cedex

Résumé

Si l'anaérobiose constitue le fondement primordial de la conservation des fourrages ensilés, les envahissements périphériques par les moisissures restent fréquents et peuvent parfois gagner la masse des stocks; des espèces micro-aérophiles se superposent alors ou se substituent même à la flore bénéfique habituelle; de cette spoliation, résultent des pertes d'aliment et des risques de toxicité pour les animaux consommateurs.

Connaissant la mycoflore responsable et le dynamisme de son évolution, il est possible d'en limiter le développement par des additifs chimiques en application superficielle. Un mélange d'acides benzoïque et formique, en proportion optimale, est proposé.

Le procédé est préconisé après étude expérimentale au laboratoire et utilisation pratique en silos industriels; son efficacité réside dans la complémentarité et la synergie des effets inhibiteurs des deux acides.

Mots clés : *Fourrages ensilés, conservation, moisissures, acide benzoïque, acide formique.*

Introduction

L'inventaire de la mycoflore des fourrages ensilés (BURMEISTER *et al.*, 1965; SCURTI *et al.*, 1968; ESCOULA *et al.*, 1972) et plus encore, son étude dynamique (PELHATE, 1974) ont montré de fréquentes déviations dans l'évolution des cortèges microbiens; en particulier, l'intervention de moisissures dégradantes ou toxinogènes peut rendre les stocks impropres à la consommation. Ce risque est concrétisé sur le diagramme de la figure 1 qui résume des observations antérieures concernant les maïs-fourrages ensilés (PELHATE, 1974). En dehors des levures, garantes des processus fermentaires bénéfiques, la plupart des champignons micro-aérophiles se révèlent suspects comme *Geotrichum candidum* (MORQUER *et al.*, 1955), *Penicillium roqueforti* (KANOTA, 1970), *Trichoderma viride* (HOU *et al.*, 1972)...

(*) III[e] Symposium International I.U.P.A.C. sur les Mycotoxines dans l'Alimentation. Paris, 16-18 septembre 1976.

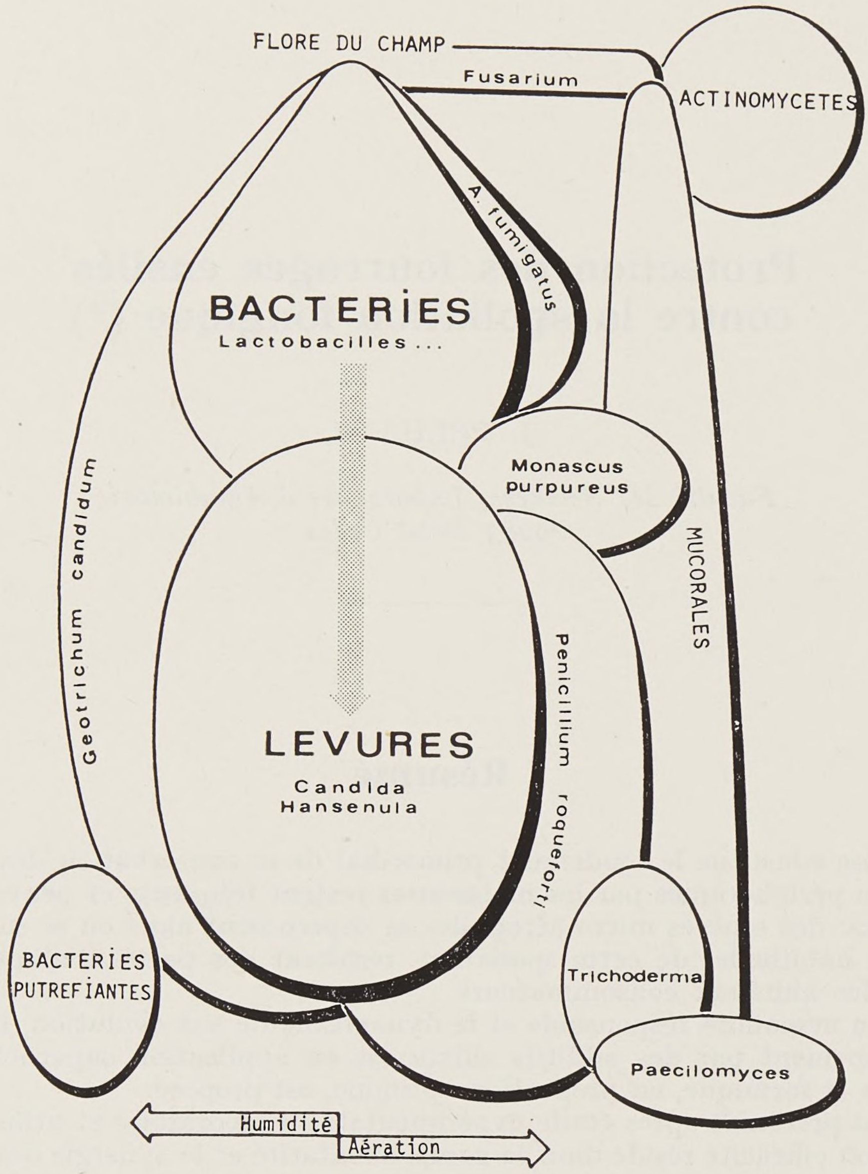


FIG. 1. — *Succession floristique sur maïs-fourrages ensilés.*
Par rapport à l'évolution normale : Bactéries → Levures, on observe des déviations fréquentes notamment à la périphérie des silos.

quand leur aptitude toxinogène n'a pas déjà été confirmée *in situ,* comme pour *Byssochlamys nivea* (ESCOULA, 1974), *Paecilomyces varioti* (MEYER, 1971), *Aspergillus fumigatus* (SMITH et MYNCH, 1973).

De telles spoliations appellent donc un traitement stabilisant. Pour ce faire, nous envisageons les acides organiques dont l'effet biostatique sur les moisissures a déjà trouvé une large application dans le domaine de la conservation des denrées fortement humides (MULTON et GUILBOT, 1973; BRITT *et al.*, 1975).

Plus précisément, notre choix s'est porté sur un mélange optimal des acides benzoïque et formique et défini après les investigations ici rapportées.

1. — Matériel et techniques

1.1. — *Expérimentation au Laboratoire*

Elle a pour but d'apprécier le pouvoir inhibiteur des acides — utilisés séparément ou en mélange — vis-à-vis des espèces fongiques prédominantes.

1.11. — *Liste des espèces contrôlées*

Les moisissures les plus déterminantes des altérations sont mentionnées sur la figure 1. Les Mucorales comportent notamment quelques *Mucor* sp. et *Rhizopus* sp.; le genre *Paecilomyces* désigne ici deux espèces : *P. varioti* et *P. niveus* (mieux connu sous sa forme ascosporée : *Byssochlamys nivea*). Nous adjoindrons l'*Aspergillus flavus* qui, moins fréquemment observé, présente cependant un intérêt particulier en matière de toxicologie. Enfin, les levures garantes des processus fermentaires bénéfiques, doivent être considérées parallèlement.

La liste devient, par ordre alphabétique : *Aspergillus flavus* (LINK; *A. fumigatus* FRES.; *Byssochlamys nivea* WEST.; *Geotrichum candidum* LINK; *Monascus purpureus* WENT; *Mucor racemosus* FRES.; *Paecilomyces varioti* BAINIER; *Penicillium roqueforti* THOM; *Trichoderma viride* PERS. ex FR.; *Candida krusei* (CAST.) BERK.; *Hansenula anomala* HANSEN.

1.12. — *Inhibition de la germination des spores et Répression de la croissance des thalles*

Les deux méthodes choisies entre autres (KOZAKIEWICZ et CLARKE, 1974) nous ont antérieurement permis de déterminer la toxicité d'acides organiques vis-à-vis des moisissures caractéristiques de produits ensilés (PELHATE, 1973*b*).

Chaque acide ou le mélange des deux (en proportions variables) est ajouté au milieu nutritif (extrait de malt gélosé) au moment du coulage en boîtes de Pétri; il n'est pas procédé au réajustement de pH qui reste compris dans les limites observées *in situ* (3, 5 à 6).

Selon le cas, les suspensions de spores sont apportées au moment du coulage ou bien les inoculums massifs sont ensemencés sur milieu consolidé.

1.13. — *Interactions spécifiques et successions floristiques*

En présence des acides, les cortèges floristiques seront perturbés dans leur évolution en raison d'une inévitable sélectivité; alors les successions seront reconstituées au vu des compétitions interspécifiques; celles-ci sont observées par les procédés antérieurement préconisés (PELHATE, 1968), soit : confrontations mutuelles (en boîtes de Pétri), cultures mixtes et cultures superposées (ensemencements de part et d'autre de disques gélosés maintenus sur anneaux réversibles).

Des doses décroissantes de produit actif, dans le milieu nutritif, permettent de simuler la rémanence limitée d'un traitement réel et de lever progressivement l'effet inhibiteur jusqu'à réapparition des espèces.

1.2. — *Expérimentation en silos*

1.21. — *Réalisation des traitements*

Sur 4 silos de maïs-fourrage répondant à deux configurations (silo-couloir et silo-taupinière respectivement), le mélange d'acides est appliqué, après ensilage proprement dit, en arrosage superficiel et selon deux modalités :

	Mélange *m*	Mélange M
Proportions acide benzoïque.	1:3	1:5
acide formique		
Doses d'application /m² :		
produit dilué	3 l	3 l
matière active.	375 g	600 g
Dose % de M.A. /poids frais	# 0,3 %	# 0,5 %

Les silos sont ensuite recouverts d'une bâche de polyéthylène. Voir, figure 2. le protocole d'un essai réalisé sur silo-couloir.

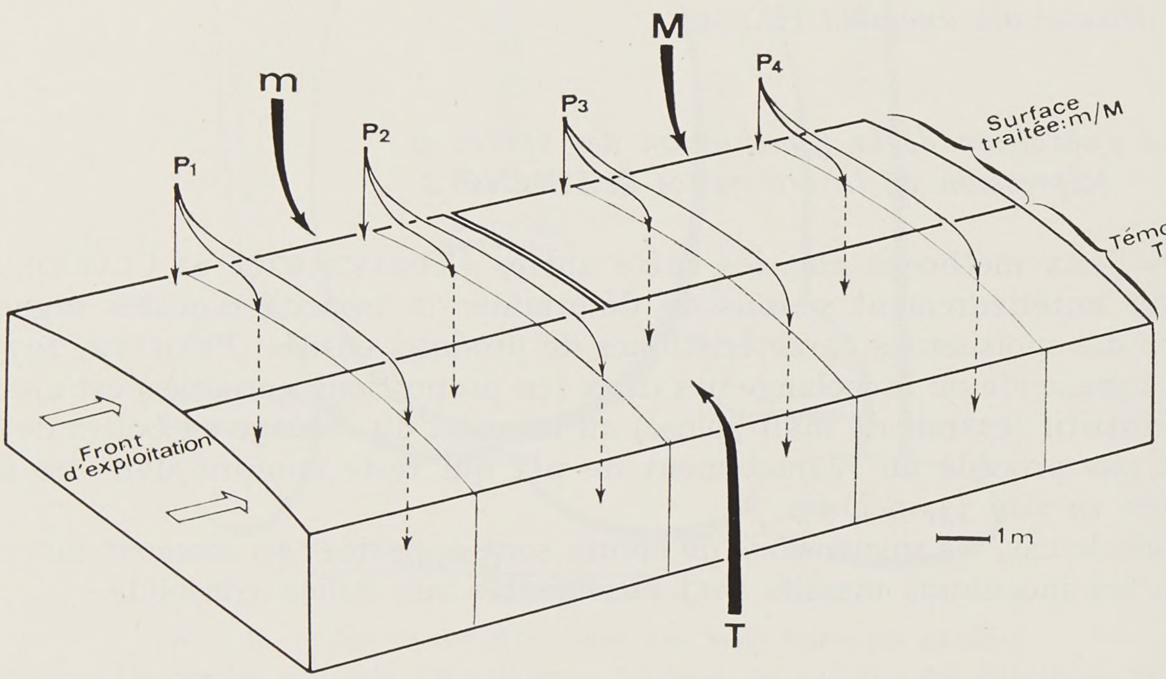


FIG. 2.— *Protocole du traitement superficiel (2 doses : m et M) et des prélèvements échelonnés (P1... P4).*

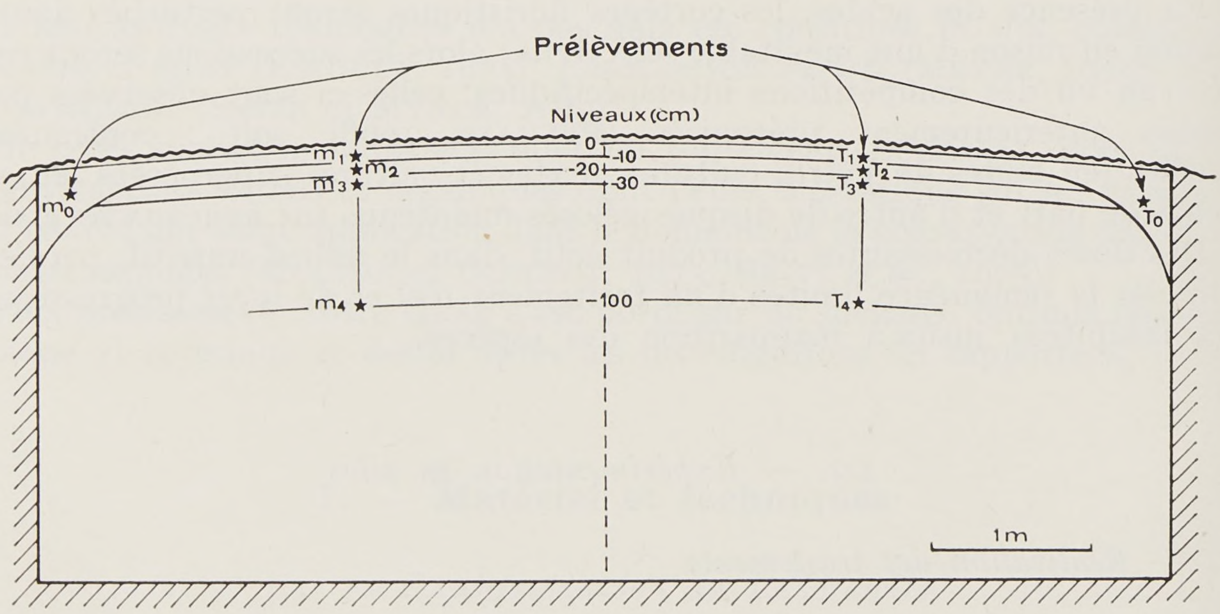


FIG. 3. — *Localisation d'une série de prélèvements sur une coupe transversale de silo.*
Échantillons témoins : T_0... T_4; échantillons traités : m_0... m_4 (faible dose) éventuellement : M_0... M_4 (forte dose).

1.22. — *Contrôle mycologique du fourrage*

Pour l'un des silos-couloirs, 4 séries d'échantillons ont été prélevées pendant la période comprise entre les troisième et sixième mois de conservation. Chacune, effectuée sur le front transversal d'exploitation (voir fig. 3), comprenait 5 échantillons témoins et 5 échantillons traités; lesquels comportaient environ 1 kg de fourrage chacun.

Les techniques d'analyse mycologique ont été définies antérieurement (PELHATE, 1974). La méthode des numérations de germes après broyage, mise en suspension et dilutions adéquates traduit le mieux le dynamisme de la flore et facilite les comparaisons recherchées.

2. — Résultats et interprétation

2.1. — *Effet biostatique des acides*

2.11. — *Effet sporostatique*

Comme il apparaît sur les figures 4 et 5, l'inhibition de la germination des spores est beaucoup plus forte en présence d'acide formique tout en restant spécifique; le *Paecilomyces varioti*, le *Trichoderma viride* et l'*Aspergillus flavus* y sont les plus tolérants.

En outre, la rémanence limitée des acides incorporés aux milieux aqueux et,

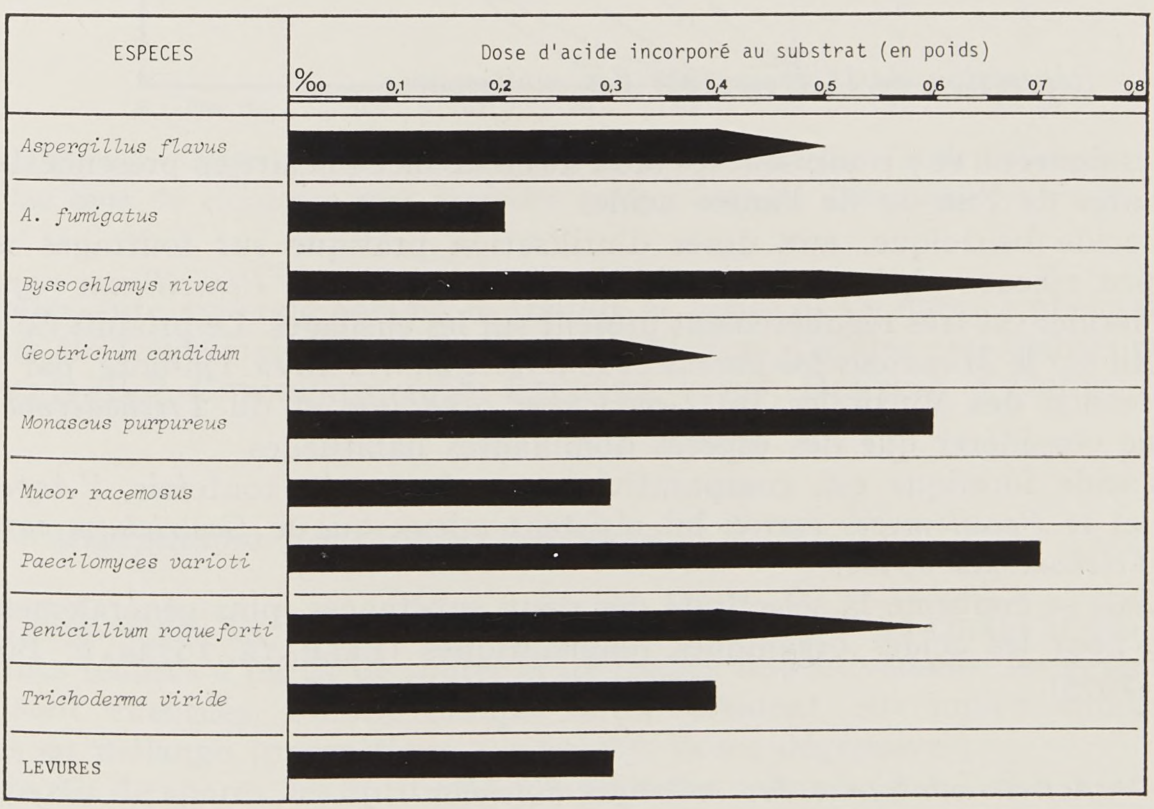


FIG. 4. — *Inhibition de la germination des spores par l'acide benzoïque.*
Les germinations sont appréciées après 5 et 10 jours d'incubation à 22 °C. Les inhibitions peuvent être totales ou graduelles à partir d'un seuil spécifique de tolérance.

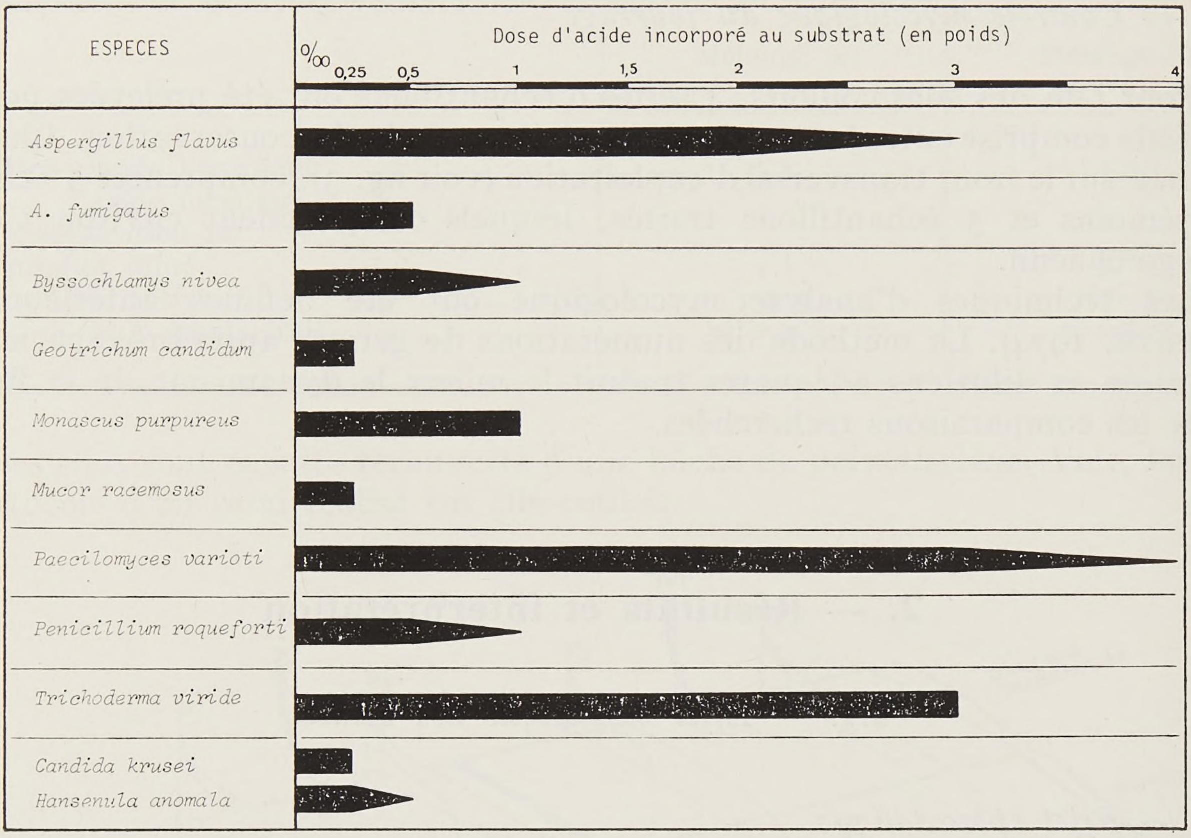


FIG. 5. — *Inhibition de la germination des spores par l'acide formique.*
Les germinations sont appréciées après 5 et 10 jours d'incubation à 22 °C.

par conséquent, leur efficacité rapidement décroissante expliquent certaines germinations différées; il en résultera, sur le plan pratique, les risques d'un traitement à effet simplement biostatique.

2.12. — *Répression de la croissance des moisissures*

Les figures 6 et 7 traduisent les taux de croissance linéaire en présence de doses croissantes de l'un ou de l'autre acide.

L'acide benzoïque, aux doses d'utilisation pratique sur fourrages mêmes, reste peu efficace vis-à-vis du *Paecilomyces varioti* et du *Penicillium roqueforti*; or, ce dernier est très régulièrement présent sur les ensilages. Le produit est encore peu actif sur le *Monascus purpureus* et le *Byssochlamys nivea.* On note, par contre, la régression des Mucorales, du *Geotrichum candidum* et du *Trichoderma viride* pour ne considérer que des espèces dominantes habituelles.

L'acide formique est, comparativement, plus actif; toutefois, l'*Aspergillus flavus* et le *Paecilomyces varioti* lui résistent mieux que le *Geotrichum candidum* et le *Trichoderma viride.*

Ainsi se confirme la sélectivité des deux substances, plus généralement rapportée pour les acides organiques fongistatiques (PELHATE, 1973*a*, *b*; BOTHAST *et al.*, 1975).

2.13. — *Action inhibitrice des mélanges d'acides*

Les mélanges d'acides benzoïque et formique en proportions variables (1 à 3; 1 à 5) présentent, aux doses actives, la complémentarité attendue, mais, en outre,

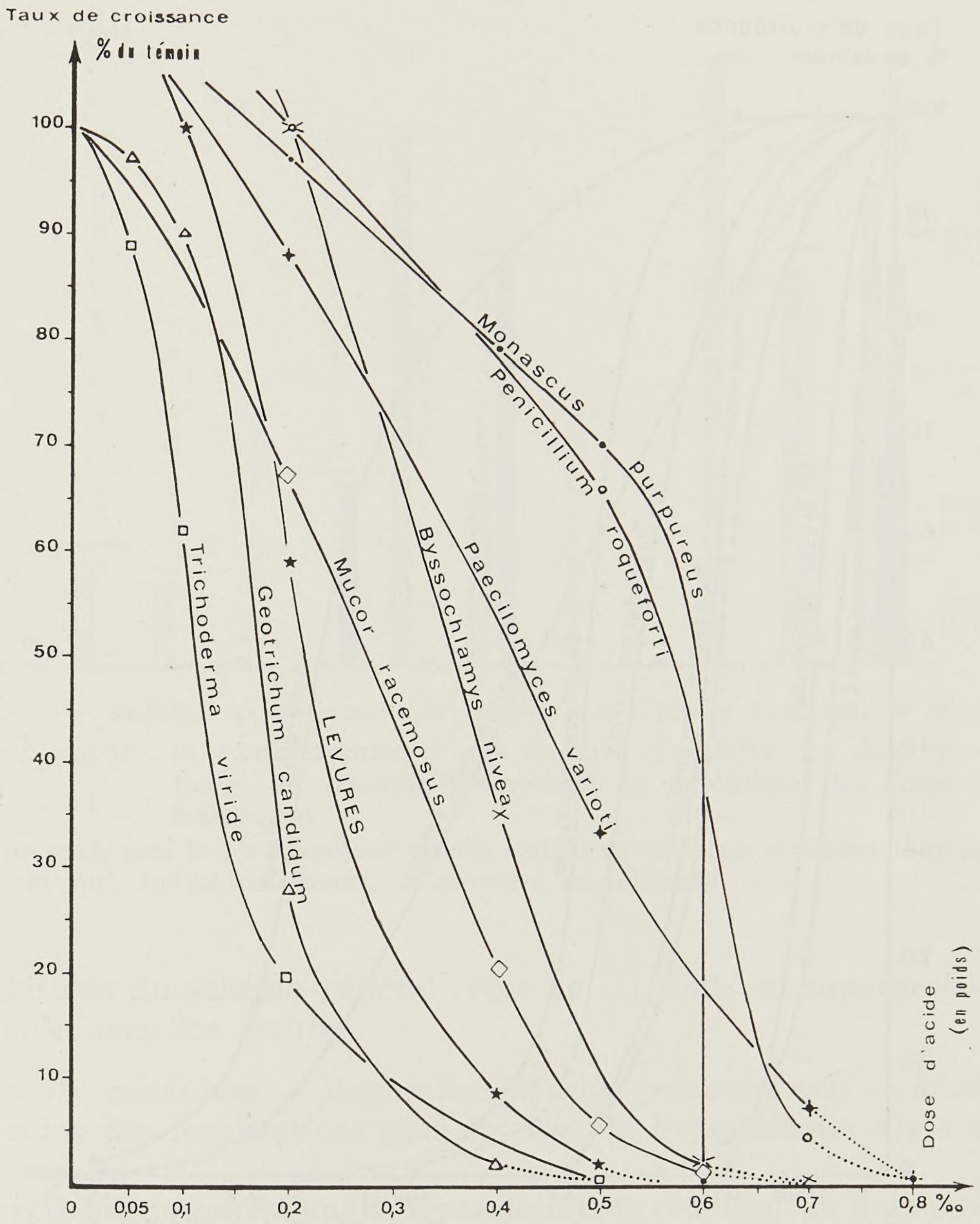


FIG. 6. — *Répression de la croissance des moisissures par l'acide benzoïque.* Les taux de croissance sont appréciés après 1 semaine d'incubation à 22 °C.

une intéressante synergie comme le traduit la figure 8. Ce dernier phénomène a d'ailleurs été fréquemment signalé pour les mélanges d'acides gras utilisés comme stabilisants (B.P. CHEMICALS, 1968; PELHATE, 1973*b*; HERTING et DRURY, 1974).

2.14. — *Modifications des cortèges floristiques*

Nous rapportons les résultats complémentaires d'essais de compétitions interspécifiques réalisés à partir de spores et de thalles respectivement; les ensemencements sont effectués, comme indiqué antérieurement, sur milieu additionnés d'acides en mélange (proportions 1:3 ou 1:5; doses dégressives).

A partir de spores, les aptitudes compétitives dominées par l'effet biostatique sélectif, conduisent à la succession suivante, nuancée par les proportions respectives d'acides benzoïque et formique :

Avec le mélange (1:3), le *P. roqueforti* se manifeste très tôt de sorte qu'il ne

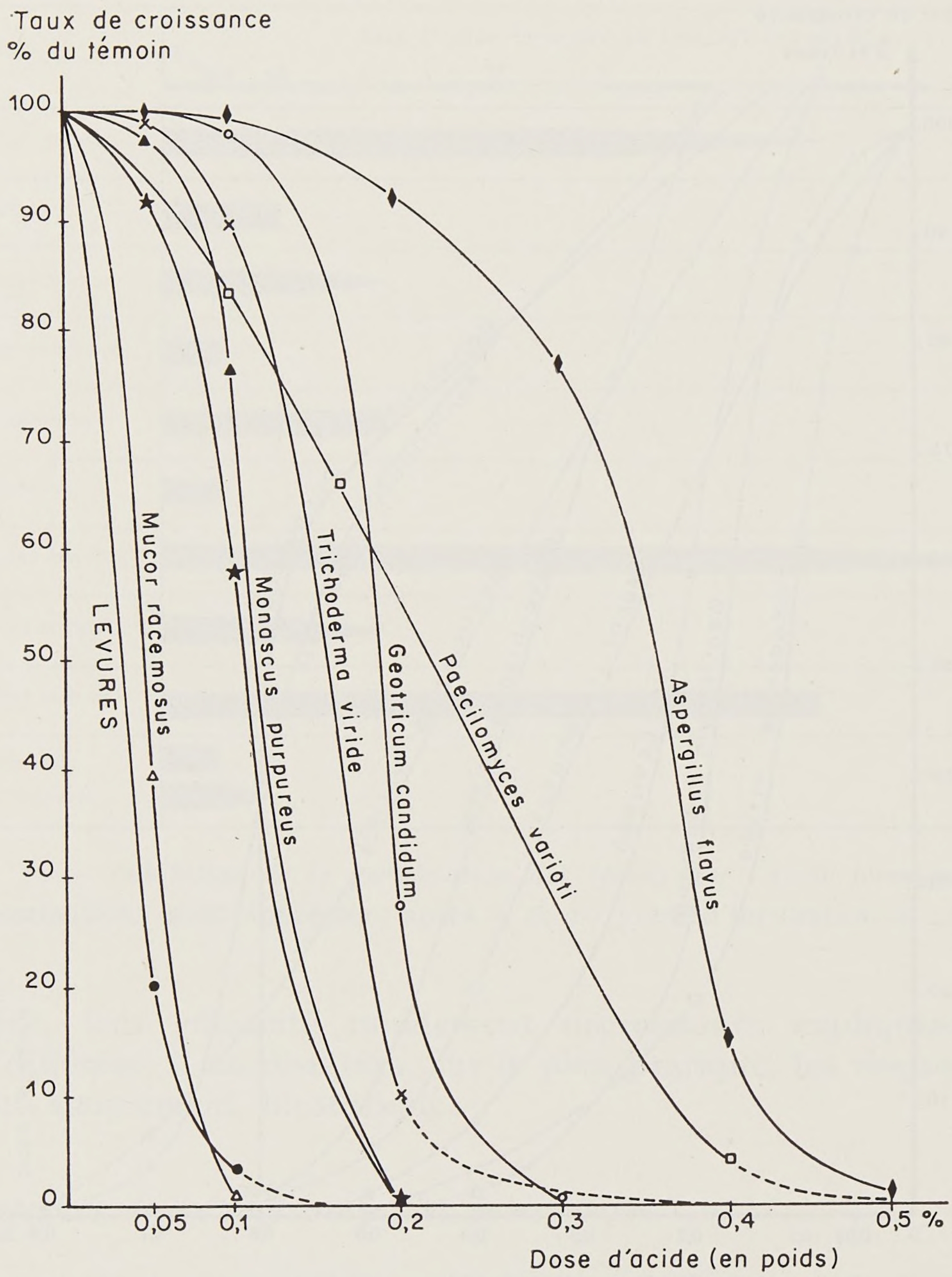


FIG. 7. — *Répression de la croissance des moisissures par l'acide formique.*
Les taux de croissance sont appréciés après 1 semaine d'incubation à 22 °C.

peut être, par la suite, surpassé que par le *Byssochlamys nivea,* ce dernier éventuellement concurrencé par le *Paecilomyces varioti.*

Avec le mélange (1:5), un premier risque réside dans l'essor précoce de l'*Aspergillus flavus,* vite neutralisé, il est vrai, par le *Trichoderma viride* puis le *Paecilomyces varioti* ou le *Byssochlamys nivea.*

A partir de thalles, le risque premier vient du *Penicillium roqueforti* avec le mélange (1:3), du *Trichoderma viride* avec le mélange (1:5); le *Byssochlamys nivea* se superposera à la première espèce, le *Paecilomyces varioti* à la seconde.

2.2. — *Essais de traitement de maïs-fourrage ensilé*

Le tableau 1 traduit l'évolution des cortèges floristiques à divers niveaux du silo et en particulier dans les strates superficielles que l'on se propose de stabiliser.

L'ensilage témoin le plus vulnérable (en la zone d'angle : T_0) présente la série

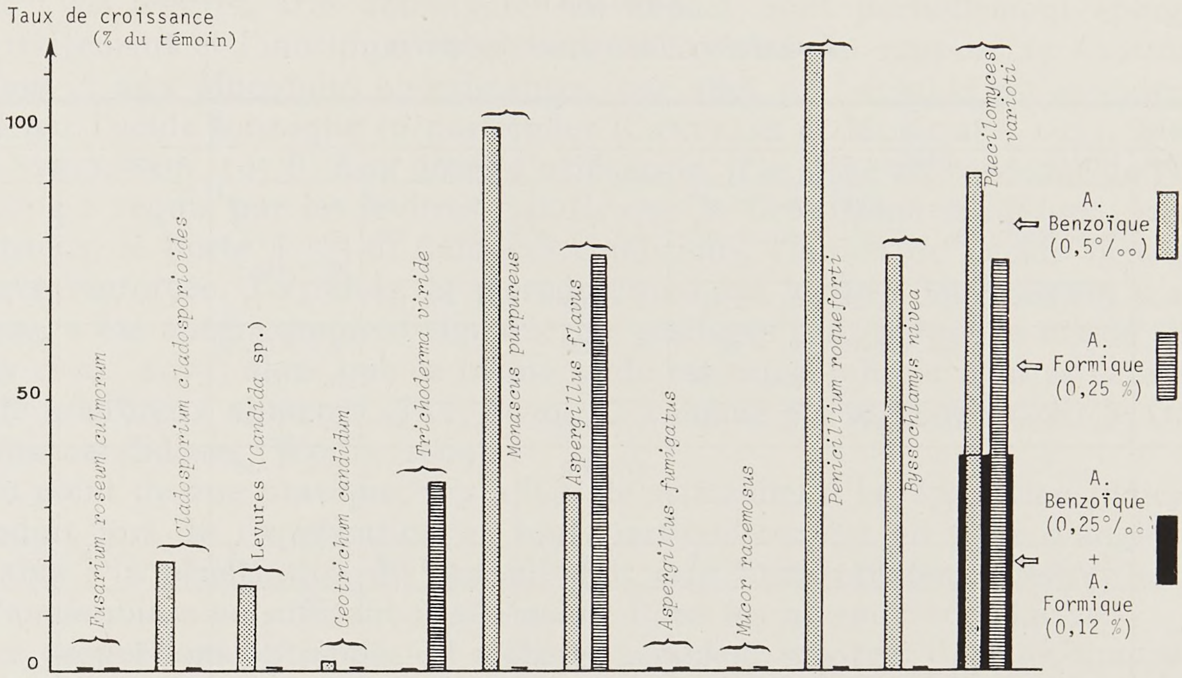


FIG. 8. — *Inhibitions de croissance en présence d'acides benzoïque et formique.*

Noter respectivement : la complémentarité des spectres d'activité des deux produits; l'effet de synergie permettant de déterminer les doses efficientes de traitement.

Dans le cas présent, seul le *Paecilomyces varioti* résiste au mélange réalisant la demi-somme des traitements qui, individuellement, se révèlent insuffisants.

évolutive dérivée du schéma général (voir fig. 1), soit, en superposition plus ou moins durable avec les levures :

Geotrichum candidum → Mucorales (*Mucor griseo-cyanus*) → *Monascus purpureus* et, selon des localisations plus étroites, le *Byssochlamys nivea* ou le *Penicillium roqueforti.*

Pour cette même zone d'angle, les traitements réduisent la flore aux premières espèces du cortège dont ils ralentissent l'évolution; c'est la preuve que le produit n'a pas touché tout inoculum et que les espèces les plus fréquentes ont toute chance d'apparaître en des sites épargnés. La dose forte n'autorise toutefois qu'un développement sporadique de ces mêmes espèces.

Plus généralement, les couches supérieures témoins (T_1, T_2 et T_3) montrent l'évolution suivante :

Geotrichum candidum → Mucorales → *Penicillium roqueforti* jusqu'à l'exclusivité de ce dernier.

Dans ces mêmes horizons traités, on observe par contre :

— dans la couche superficielle (0 à — 10 cm) :

en m_1 : Mucorales (*M. griseo-cyanus*) et *Geotrichum candidum,*
en M_1 : ces espèces ne poursuivent pas leur développement et le fourrage n'héberge plus que les levures,

— dans la couche sous-jacente (— 10 à — 20 cm) :

en m_2 : Mucorales (*M. griseo-cyanus*) et *Geotrichum candidum* subsistent par plages,
en M_2 : aucune moisissure ne se superpose aux levures bien développées,

TABLEAU I

Inventaires floristiques comparés

Prélèvements	P_1		P_2		P_3		P_4	
Echantillons	traité : m	Témoin : T	m	T	traité : M	T	M	T
— 0 cm — T_1-m_1 ou M_1 — -10 cm —	M. = 2.10^{2} L. = 5.10^{5}	G.c. = 5.10^{2} M. = 5.10^{2} L. = 15.10^{5}	M = 25.10^{3} G.c. = 10^{4} L. = 12.10^{5}	M. = 15.10^{3} G.c. = 5.10^{2} L. = 25.10^{4}	M. = 12.10^{2} G.c. = 250 L. = 15.10^{5}	P.r. = 2.10^{3} G.c. = 10^{3} M. = 750 L. = 2.10^{5}	- L. = 10^{3}	P.r. = 5.10^{4} L. = 15.10^{5}
T_2-m_2 ou M_2 — -20 cm —	- L. = 8.10^{5}	G.c. = 25.10^{2} L. = 5.10^{6}	M. = 10^{4} G.c. = 100 L. = 25.10^{5}	M. = 10^{3} L. = 4.10^{6}	- L. = 25.10^{5}	P.r. = 12.10^{2} M. = 300 L. = 3.10^{6}	- L. = 15.10^{5}	P.r. = 4.10^{4} L. = 2.10^{6}
T_3-m_3 ou M_3 — -30 cm —	- L. = 25.10^{5}	- L. = 65.10^{5}	- L. = 8.10^{6}	M. = 250 L. = 6.10^{6}	- L. = 18.10^{6}	P.r. = 400 M. = 100 L. = 15.10^{6}	- L. = 2.10^{6}	P.r. = 5.10^{4} L. = 3.10^{6}
-100 cm T_4-m_4 ou M_4	- L. = 15.10^{5}	- L. = 2.10^{6}	- L. = 2.10^{6}	- L. = 5.10^{6}	- L. = 2.10^{6}	- L. = 25.10^{5}	- L. = 4.10^{6}	- L. = 45.10^{5}
— 0 cm — angle T_o-m_o ou M_o — -30 cm —	G.c. = 8.10^{3} M. = 14.10^{2} T. = 250 L. = 4.10^{4}	M.p. = 2.10^{6} M. = 5.10^{3} G.c. = 5.10^{3} L. = 10^{5}	G.c.= 12.10^{3} A. = 200 L. = 3.10^{6}	B.n.= 4.10^{6} P.r.= 250 M. = 100 L. = 0	M.= 12.10^{2} G.c. = 250 L. = 15.10^{5}	P.r.= 2.10^{3} G.c. = 10^{3} M. = 750 L. = 2.10^{5}	- L. = 250	P.r.= 6.10^{6} T. = 200 L. = 5.10^{5}

L'évolution de la mycoflore est suivie par l'analyse de 4 séries de prélèvements P_1,P_2, P_3 et P_4. Pour tout échantillon diversement localisé dans le silo (voir fig. 3), sont rapportées les espèces dominantes ainsi que les levures, les unes et les autres affectées du nombre de germes par gramme de fourrage.

Notations symboliques :

A. = *Aspergillus* (*A. fumigatus*; *A.* gr. *glaucus*); B. n. = *Byssochlamys nivea*; G.c. = *Geotrichum candidum*; L. = Levures (*Candida* sp.); M. = Mucorales (*Mucor griseo-cyanus*, *M. racemosus*; *Rhizopus stolonifer*); M.p. = *Monascus purpureus*; P.r. = *Penicillium roqueforti*; T. = *Trichoderma* sp.

— dans la couche inférieure (— 20 à — 30 cm), aucune moisissure active n'est apparue.

Précisons, en outre, que la masse du silo, non concernée par le traitement, n'a hébergé pour toute mycoflore, que les Levures.

Conclusion

L'efficacité du contrôle recherché se vérifie à l'échelle du silo industriel et les essais en cours semblent également prometteurs. Le résultat se traduit par l'existence d'une couche superficielle décolorée, jaunâtre mais pratiquement dépourvue de moisissures et bien acceptée par les animaux consommateurs, bovins en l'occurrence.

Plus précisément, le cortège floristique susceptible de s'y développer (*Geotrichum candidum* et Mucorales) reste très sporadique; des levures (*Candida* sp.) y subsistent par contre tandis que les espèces habituellement les plus actives comme le *P. roqueforti* en sont exclues. Sans doute, est-ce là l'explication de la

réussite : les levures, très abondantes au départ, sont partiellement épargnées par le traitement et l'inoculum subsistant est favorisé par rapport au *Geotrichum candidum* et aux Mucorales co-existantes, par effet pH; celui-ci est grandement abaissé par l'acide formique en particulier (CANDLISH et MCKIRDY, 1973; DAVIDSON et STEVENSON, 1973). Aux doses d'utilisation, il se situe au voisinage de l'optimum de 4,2 requis par les levures, tandis que le *Geotrichum candidum*, premier compétiteur, le porte à 5,5-6; dans ces conditions, l'action de l'acide benzoïque se trouve renforcée. Toutefois, la recrudescence des levures, en présence d'acide formique, a été antérieurement signalée sur ensilages traités dans la masse (HENDERSON *et al.*, 1973) alors que ce même acide est censé inhiber levures et moisissures de nombreux aliments (JAY, 1970); il a même été préconisé pour le traitement des candidoses (WOOD, 1969).

Du point de vue pratique, il y a lieu de s'attacher à la répartition judicieuse du produit lors de l'application et tout particulièrement en zone d'angle plus vulnérable : la pénétration du produit doit être suffisante pour assurer le relais avec l'anaérobiose se suffisant à elle-même dans les niveaux sous-jacents.

Les proportions optimales du mélange semblent se situer dans les limites des deux essais rapportés; tandis que les doses d'applications prévues ici pour une durée moyenne de conservation de 4 et 8 mois respectivement doivent réaliser le compromis entre l'inhibition d'espèces dégradantes et le maintien des levures bénéfiques. Rappelons enfin que les doses utiles de mélange et la dilution de celui-ci lors de l'application sont encore fonction de la couche périphérique à traiter par aspersion et percolation.

Reçu pour publication en juillet 1977.

Summary

Protection of silage feed against fungic spoliation

Taking into account the mycoflora of silaged forages and their dynamic development, a chemical treatment with mixed solution of benzoïc acid and formic acid is used. The efficiency of the treatment is demonstrated.

Key-Words: *Silaged forages, conservation, mouldiness, benzoïc acid, formic acid.*

Références bibliographiques

BOTHAST R. J., ADAMS G. H., HATFIELD E. E., LANCASTE E. B., 1975. Presentation of high moisture corn: a microbiological evaluation. *J. Dairy Sci.*, **58** (3), 386-391.

B. P. CHEMICALS Ltd, 1968. Procédé pour empêcher le développement des moisissures dans les produits de récolte et les produits alimentaires pour les animaux. Brevet d'invention, Ministère de l'Industrie, Paris.

BRITT D. G., HUBER J. T., ROGERS A. L., 1975. Fungal growth and acid production during fermentation and refermentation of organic acid treated corn silage. *J. Dairy Sci.*, **58** (4), 532-539.

BURMEISTER P., HARLAND R., HARTMAN A., SAUL A. R., 1965. Microbiology of ensiled high moisture corn. *Appl. Microbiology*, **14** (1), 31-34.

CANDLISH E., MCKIRDY J., 1973. Organic acid determination on treated and untreated corn silage. *Can. J. Plant. Sci.*, **53** (1), 105-111.

DAVIDSON T. R., STEVENSON K. R. 1973. Influence of formic acid and formalin on quality of direct-cut alfalfa silage. *Can. J. Plant. Sci.*, **53** (1), 75-79.

ESCOULA L., 1974. Moisissures toxinogènes des fourrages ensilés. I. Présence de patuline dans les fronts de coupe d'ensilages. *Ann. Rech. Vétér.*, **5** (4), 423-432.

ESCOULA L., LE BARS J., LARRIEU G., 1972. Études sur la mycoflore des ensilages. I. Mycoflore des fronts de coupe d'ensilage de graminées fourragères. *Ann. Rech. Vétér.*, **3** (3), 469-481.

HENDERSON A. R., DONALD M. C., WOOLFORD M. K., 1973. Chemical changes and losses during the ensilage of wilted grass treated with formic acid. *J. Sci. Food Agric.*, **23** (9), 1079-1087.

HERTING D. C., DRURY E. E., 1974. Antifungal activity of volatile fatty acids on grains. *Cereal Chem.*, **51** (1), 74-83.

HOU C. T., CIERGLER A., HESSELTINE C. W., 1972. New mycotoxin A from *Trichoderma viride* isolated from southern leaf blight-infected corn. *Appl. Microbiol.*, **23**, 183-185.

JAY J. M., 1970. Food preservation by the use of chemical *in* Modern food Microbiology. Van Nostrand Reinhold Cy, N. Y., 328 pp.

KANOTA K., 1970. Studies on toxic metabolites of *Penicillium roqueforti* on cattle. *in* Proceedings of the first U.S. Japan Conference on toxic micro-organisms. U.S. Dept. of the Interior, Washington, 129-132.

KOZAKIEWICZ Z., CLARKE J. H., 1974. Techniques for determining toxicity of propionic acid to fungi from stored grain. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, **61** (2), 355-367.

MEYER H., 1971. Lur Kenntnis des Stoffwechsels von Stämmen der Gattung *Byssochlamys* unter besonderer Berücksichtigung der Bildung des Mycotoxins Byssochlaminsaüre. Thèse. Westfälischen Wilhelms Univ., Münster.

MORQUER, R., LOMBARD C. H., BERTHELON M., 1955. Pouvoir pathogène de quelques espèces de *Geotrichum. C.R. Acad. Sci. Paris*, **240**, 378-380.

MULTON J. L., GUILBOT A., 1973. Conservation des grains récoltés humides. VI. Problèmes liés à l'utilisation des acides organiques comme agents conservateurs. *Ann. Technol. Agric.*, n° sp., 423-562.

PELHATE J., 1968. Étude expérimentale des interactions de moisissures caractéristiques des grains. *Rev. Mycol.*, **33**, 43-70.

PELHATE J., 1973*a*. Moisissures des maïs-grains en cours de conservation. Leur inhibition par l'acide propionique. *Bull. Soc. Mycol. Fr.*, **89** (1), 53-65.

PELHATE J., 1973*b*. Stabilisation de la mycoflore des maïs-grains humides, ensilés. *Ann. Technol. Agric.*, **22** (4), 647-661.

PELHATE J., 1974. Mycoflore des maïs-fourrages ensilés. Déterminisme de son évolution. *Rev. Mycol.*, **29**, 65-95.

SCURTI J. C., CANTINI G., COLOMB B., 1968. Ricerche sui miceti di foraggi conservati e sulla loro tossicita. *Allionia*, **14**, 113-121.

SMITH D. F., MYNCH G. P., 1973. *Aspergillus fumigatus* in samples of moldy silage. *J. Dairy Sci.*, **56** (6), 828-829.

WOOD N. A., 1969. Formic acid as a prophylactic for candidasis in partridges. *Vet. Rec.*, **85** (4), 78-80.

Ann. Technol. agri., 1977, **27** (3), 331-338.

The detoxification of oil-seed cakes polluted by aflatoxins. Research and development of an industrial process (*)

C. GIDDEY, J. BRANDT, G. BUNTER

Sponsored by « Etablissements V. Q. Petersen and Cie, Dakar »
Food Research Center
Battelle Geneva
7, route de Drize, 1227 Carouge
(Geneva / Switzerland)

Summary

The proposed process is based on the combined use ofa modera tely alkaline, non volatile, inorganic agent and a highly alkaline volatile, organic agent. The effectiveness of the detoxification of groundnut as demonstrated by chemical and biological tests is discussed.

Key-Words: *Oil seed cakes, aflatoxin, detoxification.*

Introduction

The aflatoxins B_1, B_2, G_1, G_2 are mycotoxins having a carcinogenic effect at the level of the liver. They are produced by certain mould, mainly Aspergillus Flavus, and in tropical climates they pollute peanuts and other crops. Aflatoxins, of which B_1 is the most toxic, have a relatively stable molecular structure. These molecules, which are derivatives of coumarine, are characterised by a pentacyclical structure which includes in particular one or two lactonic cycles.

Food contaminated by aflatoxins are considered to be detrimental to human and animal nutrition. The F.A.O. has fixed the acceptable concentration of

(*) Patents : CH 566-110, 1973.
US 3890-452, 1974.
III[e] Symposium International I.U.P.A.C. sur les Mycotoxines dans l'alimentation. Paris, 16-18 septembre 1976.

aflatoxin in animal fodder at 50 ppb. This limit is considerably lower than the concentration of 200 to 2 000 ppb (sometimes even 2 000 or 3 000 ppb) which can be found in contaminated peanut cake. Since de-oiled peanut cake represents a very valuable source of animal feed, a great deal of research has been undertaken in order to find means of decontaminating it.

Three methods of decontaminating peanut cake have so far been proposed: fermentation, extraction and chemical treatments. For the latter, although there are a large number of chemical agents which are able to react with aflatoxins (C. E. Mann, 1970), few of them are of practical use, either because their effectiveness is limited or because they impair the food value of the proteins or simply because they are too expensive and difficult to be applied on a large industrial scale.

Chemical degradation of aflatoxins by alkaline agents

The alkaline degradation of the aflatoxins is started by opening the lactonic rings of the aflatoxins molecules. This hydrolytic scission is provoked by the medium and strong bases, particularly when the basicity of the reaction medium is higher than pH 9.5. The opening of the lactonic cycles is a reversible reaction; it must therefore be followed by oxidation, probably touching the double bond close to the carboxylic group, if reversibility is to be avoided. In fact, if oxidation does not take place, the lactonic cycles can re-form the original aflatoxin structure and hence the toxicity will reappear.

Lactonic recycling of the molecule, when not degraded by oxydation, takes place especially if the pH becomes acid, but also, though more slowly, if the pH is neutral (K. Bencze, 1972).

Detoxification of peanut cake by alkaline degradation of the aflatoxins

Strong bases are more effective. They allow hydrolysis of the lactone in the aflatoxins and formation of the salt corresponding to the carboxylic and phenol groups.

In this form, the aflatoxins oxidize in the air and are destroyed in a few minutes or a few hours according to the temperature applied.

The most difficult problem to solve is how to mix the peanut cake homogeneously with the alkaline agents, whose concentration represents several percent of the weight of the meal.

If the chemical agent is a solid, it is necessary to solubilize it or to disperse it in water so that it can blend thoroughly with the cake. If the agent is a gas, it will spread much more easily throughout the mass. It will, however, often be necessary to work under pressure in order to obtain a sufficient concentration of the reagent and to avoid its evaporation.

Of the gaseous bases, ammonia seems at first sight to be the ideal reagent. However, because of its weak basicity and its volatility, it is necessary to work under pressure for temperatures of between 80 and 100 °C. Thus, the treatment under pressure of vast quantities of cake would not be an easy industrial operation.

Combination of calcium hydroxyde and of monomethylamine for the detoxification of peanut cake

Monomethylamine (MMA) whose base is more soluble in water, more alkaline and less volatile than ammonia, creates an alkalinity of 1 to 1.5 pH units higher than the latter for the same molar concentration.

— NH_3 (ammonia) : K dissociation (25 °C) = 0.179 $.10^{-4}$; BP — 33.4 °C; solubility 20 °C (g/100 ml water) = 52.0.

— CH_3NH_2 (MMA) : K dissociation (25 °C) = 4.38 $.10^{-4}$; BP — 6.3 °C; solubility 25 °C (g/100 ml water) = 108.

Monomethylamine, in aqueous solution (usually 40 per cent concentration free base) when added to the cake makes it possible to reach a pH of the order of 9.5 to 10 if used in a concentration of 2 per cent of pure MMA base in the cake. Heating of the cake at normal pressure or under mechanical pressure (extruder press) brings about rapid hydrolisis of the lactonic cycles of the aflatoxins followed by oxidation due to high pH.

There is, however, one major disavantage in the use of MMA at the concentrations indicated above: amine gives the cake a sharp smell and an unpleasant taste which is not possible to eliminate even by applying prolonged vacuum treatment.

Our solution to this problem involves the simultaneous use of a lime milk ($Ca(OH)_2$) and an aqueous solution of MMA. The concentration of $Ca(OH)_2$ used is 2 per cent and that of pure MMA base of 0.5 per cent of the weight of the cake. Under these conditions we have the advantages of both the action of a non-volatile base (lime) and that of a strong, moderately volatile base which is extremely soluble in water.

The combined use of the $Ca(OH)_2$ and MMA serves two objectives:

— to reduce the amount of MMA used, since its role is only to obtain a high pH for a time strictly limited to the duration of the treatment. The $Ca(OH)_2$ acts *a priori* as an agent for neutralizing the natural acid functions of the cake, in particular salification of the carboxylic groups of the proteins;

— to ensure the complete elimination of the MMA after the treatment. The $Ca(OH)_2$ saturates the acid groups of cake and creates an alkalinity which maintains the MMA in its form as a free volatile base. The elimination of the MMA is facilitated by an injection of steam into the cake before the actual drying is carried out.

Chemical analysis (AOAC, 1970) has shown that more than 95 per cent of the aflatoxin B_1 is destroyed, i.e. that the concentration of aflatoxin (after treatment) is less than 50-100 ppb for an original contamination of the peanut cake of up to 2 000 ppb.

When treated samples were analysed after several months storage, it was not possible to identify the aflatoxin quantitatively ($<$ 50 ppb) thus demonstrating that the phenomenon of reactivation of the molecule by lactonic recycling was absent.

Method and material used

Aflatoxin — chemical analysis

The of quantitative determination was carried out according to the official methods analysis of (AOAC, 1970). The peanut meal is hydrated and the aflatoxin extracted with chloroform. The extracted aflatoxin is adsorbed on a silicagel column and is eluted with a chloroform/methanol solution. The aflatoxin is determined quantitatively at 365 m µ by thin layer chromatography on silicagel.

Aflatoxin toxicity on chicken embryo (Hamburger, 1951, AOAC, 1970)

The AOAC official method was used for determining the aflatoxin content of the original and the treated cake before and after treatment.

Nutritional value of the peanut meal

The biological value (BV), the net protein utilization (NPU), the digestibility (D) and the PER of raw and treated peanut cake were duly determined (on Sprague-Dawley rats) according to the usual methods.

Lysin, Methionine, Cystin

The total and available lysin was determined respectively by column chromatography and by the fluorodinitrobenzol method. The methionin and the cystin were analysed by automatic column chromatographic analysis.

Redidual Monomethylamine

The residues of MMA left in the peanut cake after treatment were determined by a gas chromatography analytical technique (Battelle Geneva unpublished).

Laboratory and Industrial $Ca(OH)_2$
Monomethylamine Aflatoxin Detoxification process

Two distincts technologies have been applied:

Technology A

The process is applied in a closed but unpressurized mixer, continuously or discontinuously :

- Temperature: 80 °C-90 °C.
- Length of treatment: from 30 to 60 min.
- Atmospheric pressure.

The powdery cake is thorougly mixed with the calcium hydroxyde slurry and the aqueous solution of MMA (i.e. 2 per cent $Ca(OH_2)$ + 0.5 per cent pure base MMA in relation to the weight of the meal. The moisture content of the cake is between 11 and 25 per cent. The cake is brought to a temperature of 80 °C-95 °C and kept at this temperature for 30 to 45 min. After treatment, the cake undergoes a steaming at atmospheric pressure and drying in order to eliminate the residual MMA. The final moisture content is about 6-10 per cent. The pH of the meal, measured in an aqueous suspension (25 per cent concentration weight/weight), passes progressively from its initial value (pH 9.5-10) to 8.5 which represents the alkalinity created by the lime.

Technology B

The process is applied in a continuous, heated screw-press extruder:

— temperature: 100 °C-110 °C.

— Length of the treatment: from 1 to 5 min.

The MMA (0.5 per cent pure base) and the lime (2 per cent $Ca(OH)_2$) are incorporated in a similar manner to that described above. The treatment of the cake is carried out in a continuous screw press equipped with a heater (temperature of the cake: 100 °C-110 °C). The cake remains in the continuous press for 4 to 5 minutes and is extruded in granules or pellets. The residual MMA and the humidity are eliminated later in a continuous dryer.

Stage of development of the $Ca(OH)_2$/MMA process

The process has been tested first on a laboratory pilot scale (1-10 kg of cake) then on a industrial pilot scale.

The tests were carried out on cake which had been de-oiled by the expeller process and the aflatoxin content varied (between 350 and 2 000 ppb) according to the batches cake: N_2 = 8.8 % — oil = 5.5 % — Moisture = 6 %.

The equipment used is standard oil-industry equipment. An installation is foreseen for the adsorption or the recuperation of the methylamine eliminated from the cake at the end of the process.

Results

Aflatoxin chemical analysis

Table 1 (next page) summarizes the results obtained by the application of the above processes to de-oiled peanut cake originally polluted by between 600 and 2 000 ppb aflatoxin B_1.

TABLE 1

Chemical analysis of aflatoxin B

Original Contamination of cake ppb Aflatoxin B_1	Technology Applied	Residual Contamination After treatment ppb Aflatoxin B_1
2 000	A : Laboratory Mixer	< 50
1 050	B : Laboratory Screw Extruder	< 50
2 000	B : Laboratory Screw Extruder	50-75
2 000	B : Pilot Screw Extruder	< 50
600	B : Pilot Pelletization press	< 50
600	A : Industrial Mixer	< 50

Summary of the biological and chemical analysis

A good correlation was obtained on chicken embryo between the chemical analysis and the biochemical analysis of residual aflatoxin in treated peanut cake. Concentration of < 100 ppb to < 50 ppm were regularly detected by both methods in the detoxified meal samples.

Nutritional value of treated meal (table 2 and table 3)

The nutritional value of the detoxified cake is usually a little lower than that of the raw material:

TABLE 2

Nutritional value

Material (peanut cake)	Aflatoxin (ppb)	Digestibility (%)	NPU (%)
Raw	2 000	85	56
Treated.	< 50	82	47
Casein diet	—	90	81

TABLE 3

Lysin, Methionine, Cystine

Material (peanut cake)	Total lysin (% in cake)	Available lysin (%)	Methionine (% destruction)	Cystine (% destruction)
Raw.	1,77	93,5	—	—
Treated	1,57	87,8	6	30

Residual methylamine

In the peanut suitably treated for detoxification, we detected after the steaming and drying steps a residual concentration of 200 to 300 ppm MMA which corresponds to an increase in nitrogen of the peanut cake of the order of 0.015 per cent (N_2 of cake = 8.8 per cent).

Conclusions

The $Ca(OH)_2$/MMA, alkalin degradation of the aflatoxin has made it possible to develop a process of detoxification of highly polluted peanut cake. The technology is characterized by its ease of application which requires the use of usual oil seed equipment with some modifications.

Reçu pour publication en juillet 1977.

Acknowledgements

We thank Messrs. R. LAROUX and M. MALENGÉ of Petersen Dakar for their helpful collaboration, as well as Mrs. C. ROGG, Miss J. QUAGLIA and Mr. R. VENTRONE of Battelle Geneva for participating in the chemical and biochemical experimentation.

Résumé

Détoxification des tourteaux de graines oléagineuses polluées par les Aflatoxines Recherche et développement d'un procédé industriel

Un procédé de détoxification de tourteaux d'arachide mettant en jeu un traitement alcalin doux et fort est décrit. L'efficacité du traitement a été éprouvée au moyen de tests chimiques et biologiques.

Mots clés : *Tourteaux de graines oléagineuses, Aflatoxine, détoxification.*

Références bibliographiques

(1) Official methods of analysis of the AOAC, 11e Éd., 1970.
(2) BENCZE K., KIERMEIER F., juin 1972. Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung, vol. **148** (5), 279.
(3) HAMBURGER K., HAMILTON, J. MORPH., 1951. **88**, 49-92.
(4) MANN C. E., CODIFER L. P. and Coll., 1970. Chemical inactivation of aflatoxins in peanut and cotton-seed meal. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **47** (5), 174-176.

Ann. Technol. agri., 1977, **27** (3), 339-342.

Controlled Atmosphere storage of High-moisture Corn and Peanuts to Control Aflatoxin Production (*)

D. M. WILSON, E. JAY, O. M. HALE and L. H. HUANG

with the technical assistance of G. PEARMAN and LUZ MARTI

University of Georgia, Coastal Plain Station, Tifton, Georgia, U.S.A. 31794
and Stored-Product Insects Research and Development Laboratory
Agricultural Research Service, Savannah, Georgia, U.S.A. 31403

Summary

High-moisture peanuts and corn were stored under controlled atmospheres and evaluated for aflatoxin contamination, fungal deterioration, and appearance. Peanuts with 16.7 per cent moisture stored for 4 weeks in air and a modified atmosphere with 1.5 per cent O_2 were contaminated with high levels of aflatoxins. Peanuts in modified atmospheres with 0.6 per cent and 0.3 per cent O_2 had 21 µg/kg aflatoxin B_1 or less. *A_2 flavus* survived in all treatments. Containers of freshly harvested uninoculated U. S. No. 2, IRN No. 4-02-931, corn with 18.8 per cent moisture were purged with 14.3 per cent CO_2, 0.5 per cent O_2 and 85.2 per cent N_2, sealed, stored for 36 and 109 days at ca. 25 C. *Aspergillus flavus* and *Fusarium moniliforme* survived and aflatoxin contamination was below 15 µg/kg. The 5-week product was used in a cafeteria trial where 3 pens of four 6-week old pigs each had free access to diets containing the modified atmosphere stored corn, 18.8 per cent moisture corn treated with 0.8 per cent propionic acid or dried corn. The modified atmosphere corn and dried corn diets were preferred. Six barrow pigs (initial wt. 12.9 kg) were used in a triplicated 2 × 2 × 2 latin square design digestion trial. There was little difference in the digestability of the diets.

Key-Words: *Corn-peanuts, storage aflatoxins.*

Peanuts (groudnuts) *Arachis hypogea* L. and corn (maize) *Zea mays* L. are good substrates for the growth of the *Aspergillus flavus* LINK ex FR. group and are prone to aflatoxin contamination especially under high-moisture conditions.

LANDERS, DAVIS and DIENER (1967) and SANDERS, DAVIS and DIENER (1968) used modified atmospheres in pilot studies to reduce aflatoxin contamination of peanuts. WILSON and JAY (1975) and WILSON and JAY (1976) extended these

(*) IIIe Symposium International I.U.P.A.C. sur les Mycotoxines dans l'Alimentation. Paris, 16-18 septembre 1976.

studies to include corn and different levels of CO with peanuts. WILSON, HUANG and JAY (1975) found that *A. flavus* and *Fusarium moniliforme* (Sheld) Snyd. et Hans. survived in high-moisture corn, and *A. flavus* survived in uninoculated peanuts.

Modified atmosphere storage of high-moisture corn shows promise in holding corn for short periods without insect activity and aflatoxin contamination. This study was designed to find if modified atmosphere storage was suitable for corn to be used as feed.

Methods and materials used

Two 121-liter plastic containers were filled with ca. 70 kg of freshly harvested 18.8 per cent moisture U.S. Number 2 IRN No 4-02-931 corn and purged for ca. 20 minutes at 11,000 cc/min with gas containing 14.3 per cent CO_2, 0.5 per cent O_2 and 85.2 per cent N_2. The gas was introduced near the bottom of the containers through a piece of 0.6 cm i.d. copper tubing which ran through the lid of each of the containers and down into the corn to a depth of 64.8 cm. Pressure was relieved through a short piece of 0.6 cm i.d. copper tubing mounted in the lid opposite the gas inlet tube. Three gas sampling tubes were mounted from top to bottom on one side of each container to facilitate withdrawl of the interstitial atmosphere of the corn. Additionally, a wide-range humidity sensor (American Instrument Co., Silver Spring, Md.) was placed in the approximate center of the corn. This sensor was also equipped with a thermistor for temperature measurement.

After the initial purge, the containers were sealed and gas samples were drawn from them for analysis during the holding periods. The samples were taken from the container with a gas-tight syringe and injected into a Fisher-Hamilton Model 29 gas partitioner (Fisher Scientific Co., Atlanta, Ga.) equipped with a Beckman 25.4 cm recorder (Beckman Instruments, Inc., Fullerton, California) with build-in integrator and a Disc model 610 automatic printer (Disc Instruments, Inc., Santa Ana, California).

The corn was sampled using previously described methods (WILSON and JAY, 1975, WILSON, HUANG and JAY, 1975) for aflatoxin contamination and fungal contamination at the beginning of the experiment and after 36 and 109 days of storage.

Results

One container was opened after 36 days of storage and sampled for aflatoxins and fungi. The corn contained no detectable aflatoxins when obtained, however 25 per cent of the kernels contained the *A. flavus* group, 35 per cent contained *F. moniliforme,* and 21 per cent of the kernels contained other fungi. After 36 days storage in the modified atmosphere no aflatoxins were detected and 30 per cent of the kernels contained *A. flavus* and 47 per cent contained *F. moniliforme.* The remaining corn was ground and used in a feeding experiment. Another sample of corn stored for 36 days in air contained 472 μg/kg aflatoxin B_1 and 35 μg/kg aflatoxin B_2.

The container stored for 109 days under modified atmosphere storage had a higher average O_2 concentration; 15 μg/kg aflatoxin B_1 and a trace of aflatoxin

B_2 was detected. *A. flavus* was recovered from 47 per cent of the kernels, *F. moniliforme* from 22 per cent of the kernels and 27 per cent of the kernels contained a *Penicillium* species. The remainder of the corn was ground and used as part of a pig digestibility diet.

Table 1 presents the results of the gas sampling, temperature and relative humidity measurements during the storage period. Container 1 did not leak and the initial purge was not supplemented during the storage period. Container 2 developed a leak and periodic purges of the gas were made when the concentration of O_2 was 2 per cent or more during the first 30 days of its total 109 days of storage. After the first 30 days a constant flow was maintained at a rate of 200 ml/min for the balance of the storage period.

The CO_2 rose a high as 18.1 per cent in container 2 due to respiration during the 109 day storage period. The high CO_2 concentrations (up to 29.9 per cent) found in container 1 were not seen in container 2, since this container was repurged with gas containing 14.3 per cent CO_2.

TABLE 1

Gas concentrations, temperature, and relative humidity in containers of higs-moisture corn

Container No.	Days held	No. readings	% gas concentration (1)				Temperature (°C)		Relative humidity (%)	
			Avg.		Range		Avg.	Range	Avg.	Range
			CO_2	O_2	CO_2	O_2				
1.	36	75	21.5	0.7	11.9-29.9	0.3-0.9	23.1	15.5-24.4	89.0	83.0-91.0
2.	109	94	15.3	1.6	12.0-18.1	0.2-7.0	24.2	16.6-26.6	81.7	73.0-86.0

(1) Balance of concentration is N_2.

Discussion and conclusions

In previous experiments small quantities of corn or peanuts were used to predict the storability of high-moisture products under modified atmospheres. Briefly, high-moisture corn can be stored under modified atmospheres produced by controlled-atmosphere generators with an observable effect on one quality factor; an increase in the fermentation-like odor (Wilson and Jay, 1975). *A. flavus* and *F. moniliforme* are among the dominant fungi in freshly harvested corn or peanuts in the Southeastern United States and survive with little growth under modified atmosphere storage only if the O_2 concentration is less than 1 per cent (Wilson, Huang and Jay, 1975; Wilson and Jay, 1975).

The results described here on exposure of two 70 kg containers of corn to modified atmospheres for 36 and 109 days demonstrate that larger quantities of corn behave similar to small quantities in aflatoxin content and fungal survival.

Also, visual observations demonstrated almost complete control of insect activity. This quantity provided enough corn to do a pilot scale pig feeding study for palatibility and digestability.

The results indicate that many insects, growth of *A. flavus*, and aflatoxin contamination can be controlled with an atmosphree O_2 content less than 1 per cent; with O_2 levels above 1 per cent aflatoxins probably will be formed. Also, the product is apparently useful as feed. Containers of freshly harvested uninoculated U.S. No. 2 corn with 18.8 per cent moisture were purged with 14.3 per cent CO_2, 0.5 per cent O_2, and 85.2 per cent N_2, sealed, stored for 36 and 109 days at ca 25 C. *A. flavus* and *F. moniliforme* survived and aflatoxin contamination was below 15 μg/kg. The 5-week product was used in a cafeteria trial where 3 pens of four 6-week old pigs each had free acess to diets containing the modified atmosphere stored corn, 18.8 per cent moisture corn treated with 0.8 per cent propionic acid or dried corn. The modified atmosphere corn and dried corn diets were preferred. Six barrow pigs (initial wt. 12.9 kg) were used in a triplicated 2 × 2 × 2 latin square design digestion trial. There was little difference in the digestibility of the diets. The animal feeding data will be published in more detail elsewhere.

Reçu pour publication en juillet 1977.

Résumé

Conservation sous atmosphère contrôlée de maïs et d'arachides à humidité élevée pour suivre la production d'aflatoxine

Arachides et maïs humides ont été stockés sous atmosphère contrôlée. On détermine la teneur en aflatoxine et le niveau de contamination par la mycoflore. Les arachides ayant une teneur en eau de 16,7 p. 100 stockées pendant 4 semaines sous 1,5 p. 100 O_2 sont très contaminées par les aflatoxines. *A. flavus* survit à tous les traitements; des essais sur maïs ont été également effectués et leur valeur nutritionnelle mesurée.

Mots clés : *Maïs, arachides, stockage, aflatoxines.*

References

LANDERS K. E., DAVIS N. D., DIENER U. L., 1967. Influence of atmospheric gases on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in peanuts. *Phytopathology*, **57**, 1086-1090.

SANDERS T. H., DAVIS N. D., DIENER U. L., 1968. Effect of carbon dioxide, certain temperatures and relative humidity on production of aflatoxins in peanuts. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **45**, 683-685.

WILSON D. M., HUANG L. H., JAY E., 1975. Survival of *Aspergillus flavus* and *Fusarium moniliforme* in high-moisture corn stored under modified atmospheres. *Appl. Microbiol.*, **30**, 592-595.

WILSON D. M., JAY E., 1975. Influence of modified atmosphere storage on aflatoxin production in high moisture corn. *Appl. Microbiol.*, **29**, 224-228.

WILSON D. M., JAY E., 1976. Effect of controlled atmosphere storage on aflatoxin production in high moisture peanuts (groundnuts). *J. stored Prod. Res.*, **12** (in press).

Ann. Technol. agri., 1977, **27** (3), 343-351.

Reduction of Mycotoxin Contamination in Peanuts Through Resistant Variety Development (*)

R. E. PETTIT, Ruth A. TABER, O. D. SMITH and B. L. JONES

With the Technical Assistance of P. J. IVES and Sharon LOCKE

Texas A. and M. University
Texas Agricultural Experiment Station
College Station, Texas 77843 U.S.A.

Summary

The need for fungal-resistant peanuts has motivated a search in the world peanut collection for pods and seed coats which resist fungal penetration. Tissues of pods and seed coats from resistant genotypes have been examined histochemically with the light microscope and structurally with the transmission and scanning electron microscopes. Significant biochemical and structural differences have been associated with an ability to restrict fungal penetration. Tissues which contained lignin, tannin, callose and cellulose have been revealed through staining techniques. Pods of all genotypes examined contained lignin but deposition was greater in pods of PI 365553, PI 341885, PI 295233, and TP 1025. Pods of PI 337409 stained heavily for tannin and callose. Exocarpic tissues with thickened cell walls were observed near the pod surface of PI 365553. Heavy lignin deposition, good pod strength, and resistance to fungal penetration were characteristics observed in Texas breeding line TP 1025. The most resistant pods contained compact sclerenchyma (sclereid) bands within the mesocarpic tissues. Fungi failed to penetrate intact sclerenchyma bands. Seed coats of PI 337394 and PI 337409 contained a more even deposition of wax on their surfaces and had a compact arrangement of palisade-like cells.

Introduction

Aflatoxin contamination of peanuts continues to be a serious problem wherever peanuts are produced in the world. Prevention of contamination is the most logical solution to the mycotoxin problem since removal of the toxin is costly and tends to destroy product quality. Contamination can occur at any point in the production, harvesting, curing, storage and handling processes.

(*) III^e Symposium International I.U.P.A.C. sur les Mycotoxines dans l'Alimentation. Paris, 16-18 septembre 1976.

Proper management can reduce fungal growth and further contamination during all of these processes. For example, peanuts grown on soil containing a low incidence of the fungus are less likely to become contaminated. Maintenance of optimum soil moisture throughout the growing season reduces fungal penetration (4, 8). Reduced exposure time to high moisture levels and high temperatures during harvest and curing reduces contamination (1, 2). Use of inverter-type diggers to keep the peanuts off the soil surface during curing results in more rapid drying and less fungal invasion. Storage of peanuts at moisture levels between 7 to 10 per cent reduces the chance of damage in storage. Storage in well ventilated facilities with adequate temperature and humidity controls reduces the chances of fungal activity within the storage facility.

Since complete control of mold contamination in peanut products cannot be accomplished at any single step in the production through manufacturing process, increased efforts are needed to develop peanut cultivars resistant to fungal invasion. Genotypes resisting *Aspergillus flavus* penetration have been discovered (5, 6). PI 337394 and PI 337409 were classified as resistant and Florunner as moderately resistant. The nature of resistance was found to be related to the seed coat features (3, 9). Growing conditions were found to influence seed coat structure and water uptake rate following drying in seeds of the resistant lines (3). Seed of PI 337394 and PI 337409 dried faster following maturation under field conditions. Peanut seeds which rapidly attain safe storage moisture levels upon maturation have surface and internal features which restrict mold invasion, are slow to absorb water during damp showery weather and have been shown to be less susceptible to *A. flavus* penetration and aflatoxin contamination. Recent efforts have been directed towards a screening of USDA plant introductions for peanut pods which can resist *A. flavus* penetration. Initial findings reported at the Scanning Electron Microscopy Workshop in Canada revealed that structural differences exist among several different peanut cultivars (7).

Association of biochemical features of these peanut tissues and possible resistance to fungal penetration have been examined. This paper reports some biochemical and morphological comparisons of pod tissues among peanut genotypes which may be used to reduce the incidence of aflatoxin contaminated peanuts within the food and feed chain.

Materials and methods

Peanut seed of several commercial varieties (Starr, Chico, Goldin I, Florunner and Tamnut. 74) along with a large number of plant introductions obtained from Dr. K. H. Garren, Holland Station, Virginia; Dr. A. C. Mixon, Georgia Coastal Experiment Station; and W. R. Langford of Experiment, Georgia were planted in field plot trials in Texas. Mature peanuts of various plant types were carefully harvested, cured and stored for use.

Pod and seed coat tissues were prepared for light and scanning electron microscope examination using standard preparation techniques altered so as to obtain desirable microscopic sections. Free hand sections of seed coats and pod tissues were used since fixation and sectioning treatments tended to reduce the section quality. Histochemical stains were used on free hand sections throughout these experiments. Thin sections of various tissues were prepared by fixation in FAA, embedded in paraffin and cut on a rotary microtome, followed by staining with

Orange G and thionin or safranin and fast green. Histochemical stains commonly used for thin microscopic sections were used on thick hand-sections for lignin, tannin, callose and cellulose. Photomicrographs of stained sections were obtained with the aid of a dissecting microscope.

Pod sections for examination with the scanning electron microscope were cut free hand with razor blades. Superior sections were selected under the dissecting microscope and fixed in 0.1 M sodium cacodylate buffered (pH 7.2) 3 per cent gluteraldehyde/3 per cent acrolein for 12 h at 20C. Following fixation the sections were washed in buffer and post-fixed in buffered osmium tetroxide for one hour. Sections were again cut in 30 per cent ethanol in order to obtain a smooth pod surface for scanning. They were then critical point dried with CO_2 in a Denton model DCP-1 drier, mounted on aluminum stubs with silver paint, and coated with gold-palladium in a sputtering device. Prepared specimens were examined and photographed in either a JEOL model JSM —U3 or JEM— 35 scanning electron microscope.

Results and discussion

Peanut seed coats of PI 337394 and PI 337409 differed from seed coats of the susceptible commercial varieties in the size and shape of the hila, amount and type of cuticular wax deposition on the exterior surface of the seed coat, thickness of the palisade-like layers and the size and arrangement of cells within these layers. The hila of the more resistant lines were small and closed compared to larger and more open hila of other peanut types. The wax layer on the resistant lines was more compact and platelike. The palisade-like cell layers within the seed coats were more compact and the cone shaped cells near the the seed coat surface were closely arranged. Breaks of any type in the seed coat allowed *A. flavus* to rapidly colonize the cotyledons of resistant and susceptible seeds.

Microscopic examination of peanut pod tissues has identified three distinct morphological layers, the outer exocarp, central mesocarp and inner endocarp. The exocarp consisted of 5-10 layers of compressed parenchymatous cells (fig. 1 and 2). The mesocarp or central portion of the pod consisted of a ring of vascular bundles, interfascicular parenchyma, and a distinct ring of sclerenchyma fibers with upward extensions under the vascular bundles. The endocarp tissues consisted of parenchyma cells which became compressed as seed maturation progressed.

Histochemical staining revealed that the sclerenchyma bands contained high levels of lignin and cellulose. Peanut pods of PI 341885, PI 295233, PI 365553 and Texas breeding line TP 1025 contained the greatest overall deposition of lignin. Pods of PI 337409 stained heavily for tannin and callose while pods of Florunner and PI 337409 stained heavily for tannin. Pectin was found within the parenchyma zones of all cell wall tissues and cellulose was found within the endocarpic parenchyma cells of all pods. Differences in the rates of staining indicated that tissues differed in other respects and the stage of pod development significantly influenced the degree that specific chemical constituents were deposited.

Significant structural differences in the exocarp and mesocarp layers were noted within the pod tissues more tolerant to fungal invasion. Mature pods of the Florunner cultivar (fig. 3) contained large areas of interfascicular parenchyma between the sclerenchyma arms extending up to the vascular bundles. Pod tissues of PI 341885, PI 295233 and PI 365553 (fig. 4) exhibited an increased

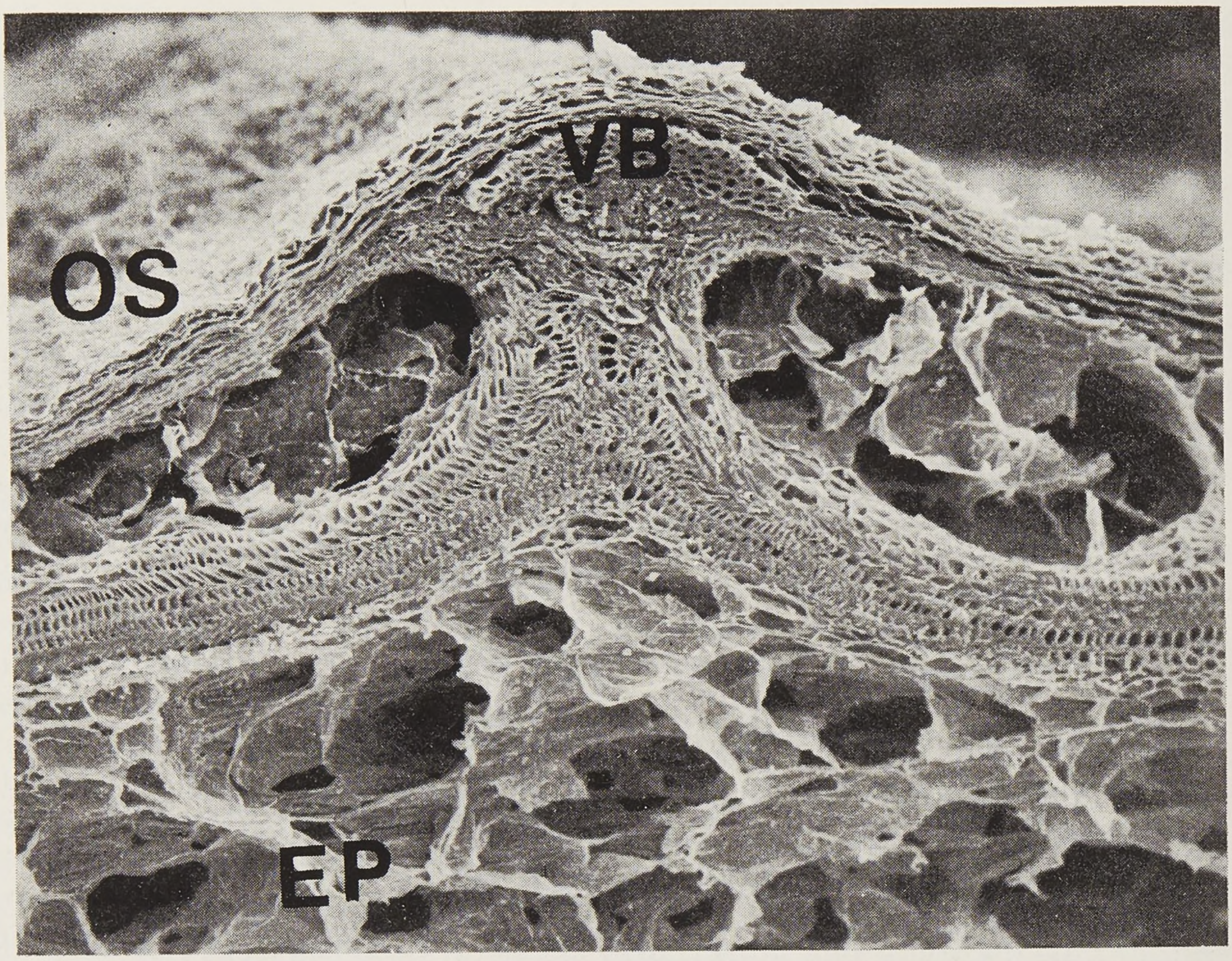


FIG. 1. — *Cross section of immature peanut pod of the cultivar Tamnut 74. VB-vascular bundle, OS-outer pod surface, EP-endocarpic parenchyma.*

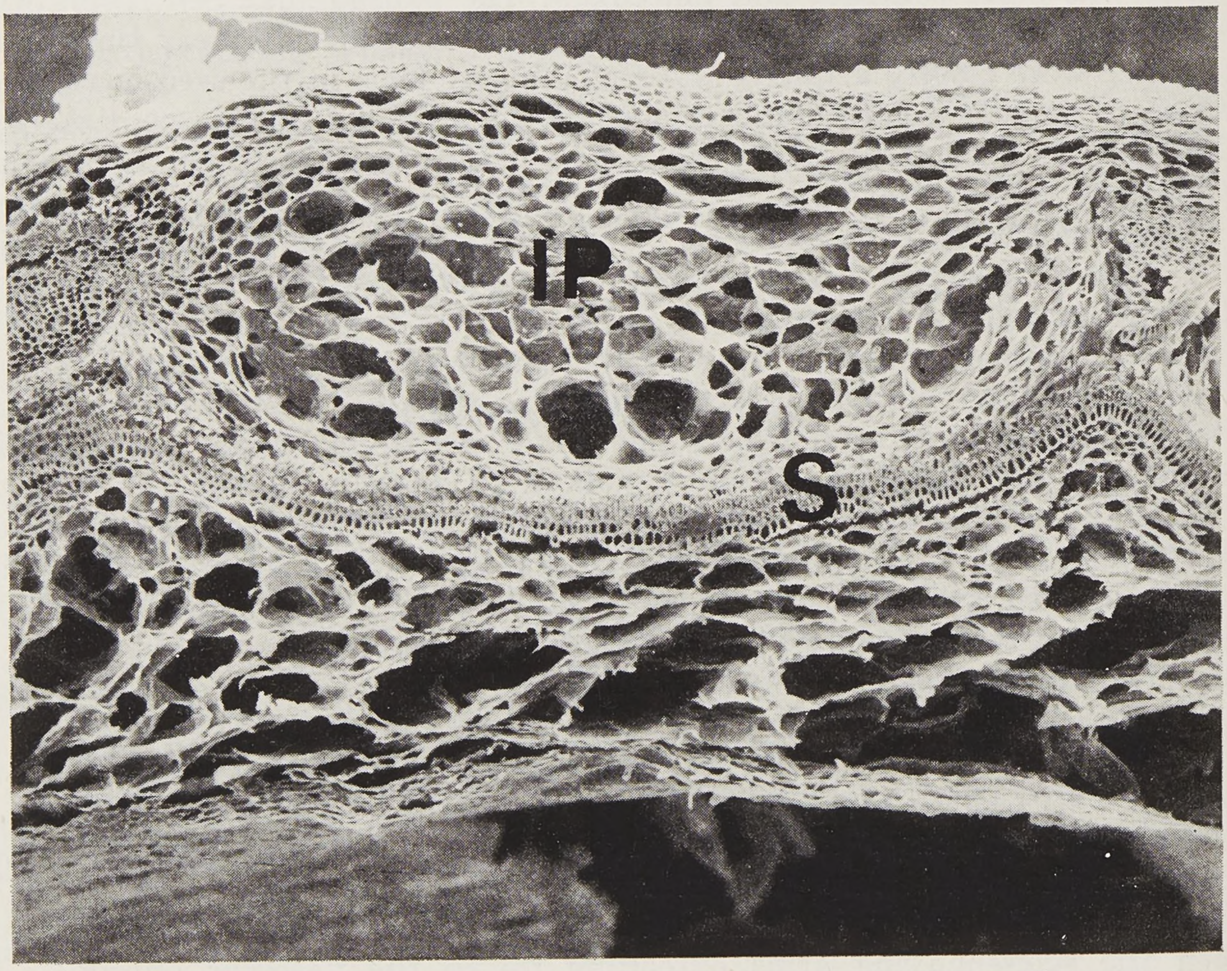


FIG. 2. — *Cross section of immature pod of the peanut cultivar Florunner. IP-interfascicular parenchyma, S-sclerenchyma band in early stages of development.*

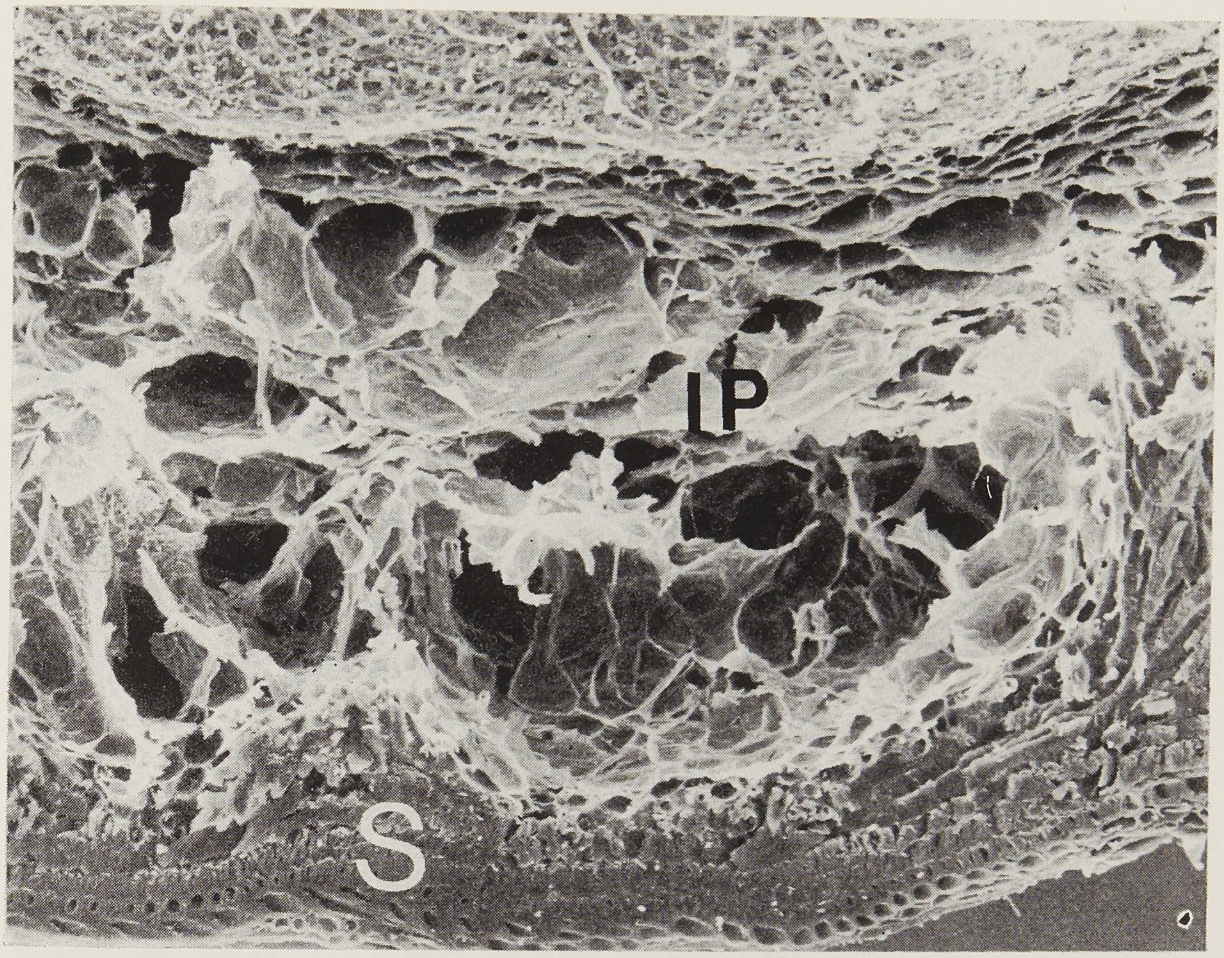


FIG. 3. — *Mature Florunner pod section. IP-interfascicular parenchyma, S-sclerenchyma band.*

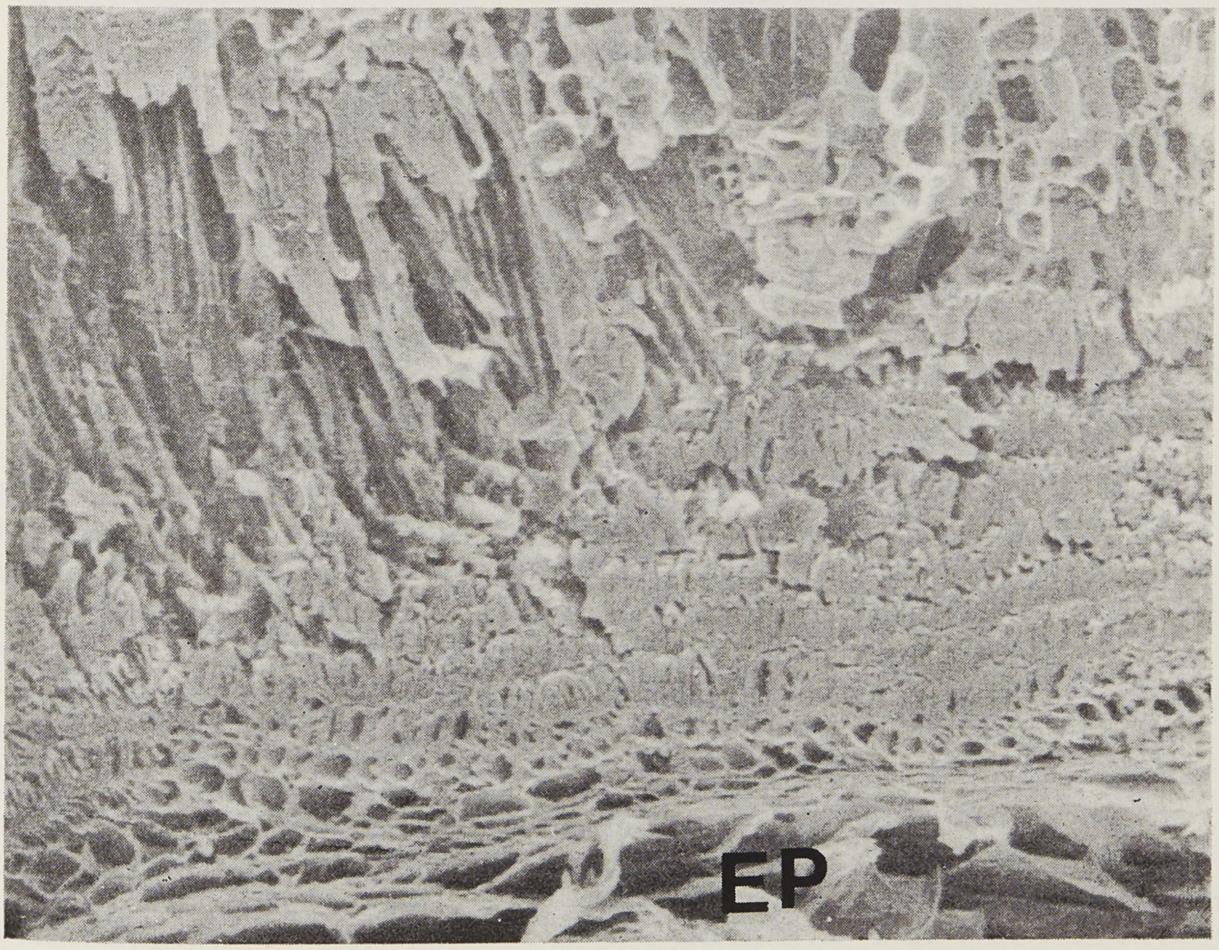


FIG. 4. — *Sclerenchyma tissue of PI 365553 pod. EP-endocarpic parenchyma.*

thickening of the sclerenchyma ring and a greater compaction of the sclereids that were orientated in several planes.

In addition to the more densely structured sclerenchyma in pods of PI 365553, parenchyma cells near the pod surface had thickened walls and a more compact arrangement of surface components. Cells of Florunner pods (fig. 5) contained

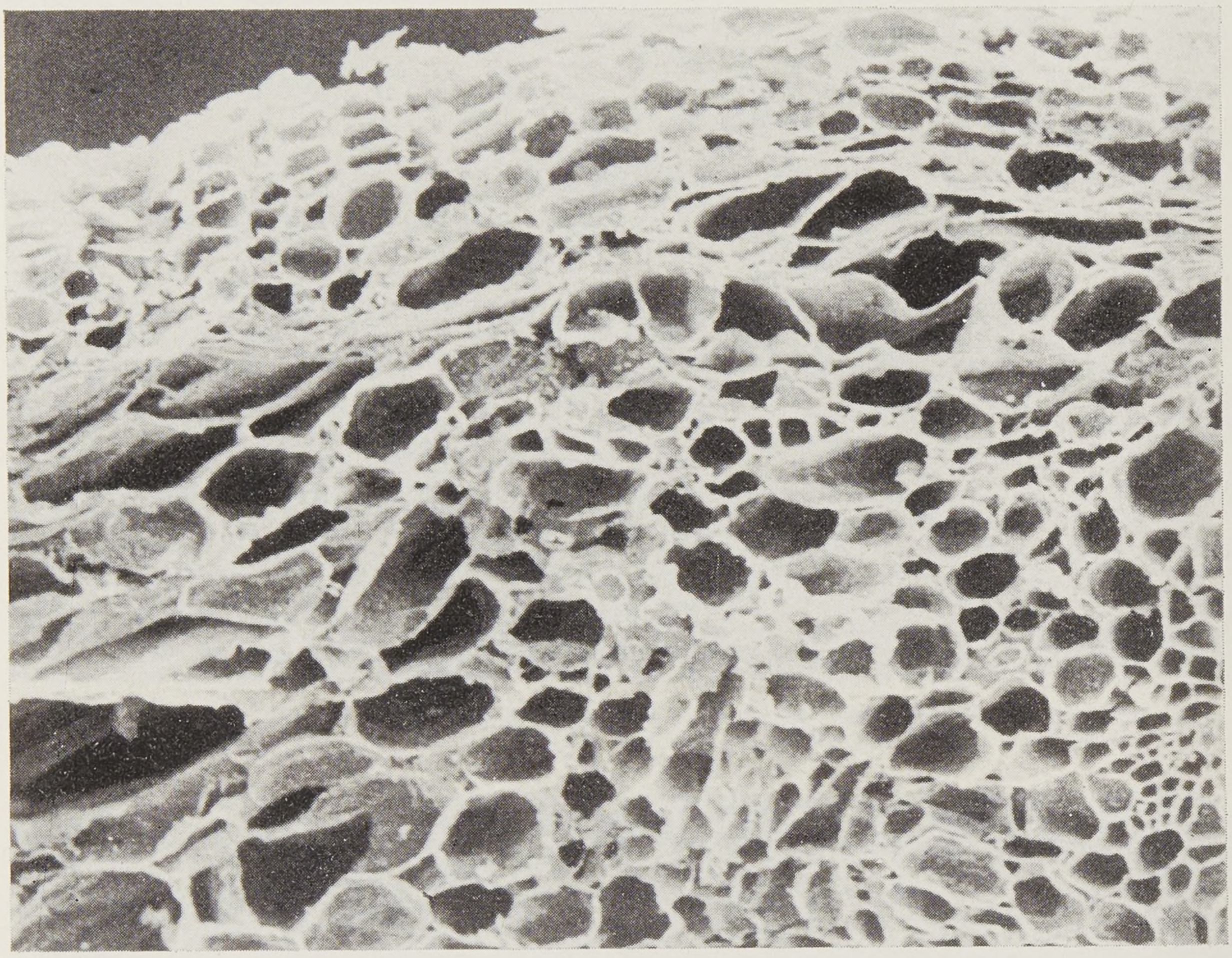


FIG. 5. — *Cross section of Florunner pod within the exocarpic region.*

thin walled parenchyma cells while those of the resistant PI 365553 (fig. 6) are thickened, pitted, and arranged in a different pattern. The pod surface of PI 365553 (fig. 6) was composed of a thickened mass of corklike tissues which gave the pod surface a smooth feature.

The sclerenchyma band within the endocarp of PI 365553 also contained some thick walled cells (fig. 7). Note the sclerenchyma band in the lower portion of figure 7 where individual cellular features appear to have been lost as the sclerenchyma formed. These scleritized tissues contained heavy deposits of lignin and tended to crack in the vertical but not in the horizontal planes.

Pod tissues of productive lines from the Texas peanut breeding program have been examined for structural and biochemical features. Texas breeding line TP 1025 pod tissues had some of the desirable features. As shown in figure 8, the sclerenchyma cells of TP 1025 pods are arranged in compact bands with orientation in several planes. Some increased lignification of the exocarpic parenchyma was observed in pods of TP 1025.

Crosses among several genotypes with fungal resistant pods and commercially acceptable cultivars have been made. Indications are that several generations of selfing following crossing and backcrossing will be required to stablize characters

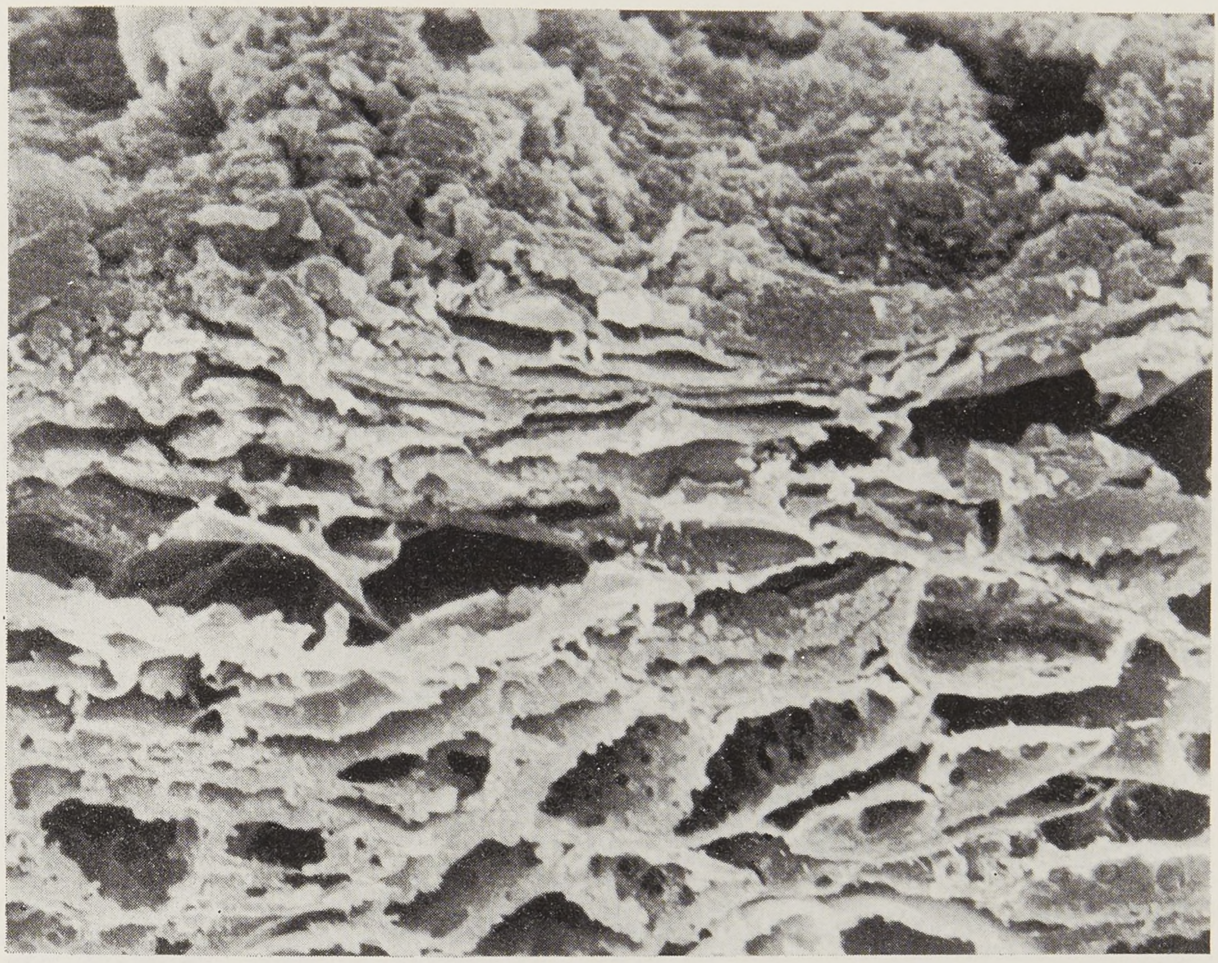


FIG. 6. — *Cross section of PI 365553 pod within the exocarpic region.*



FIG. 7. — *Cross section of the endocarpic region of a PI 365553 pod. S-sclerenchyma band.*

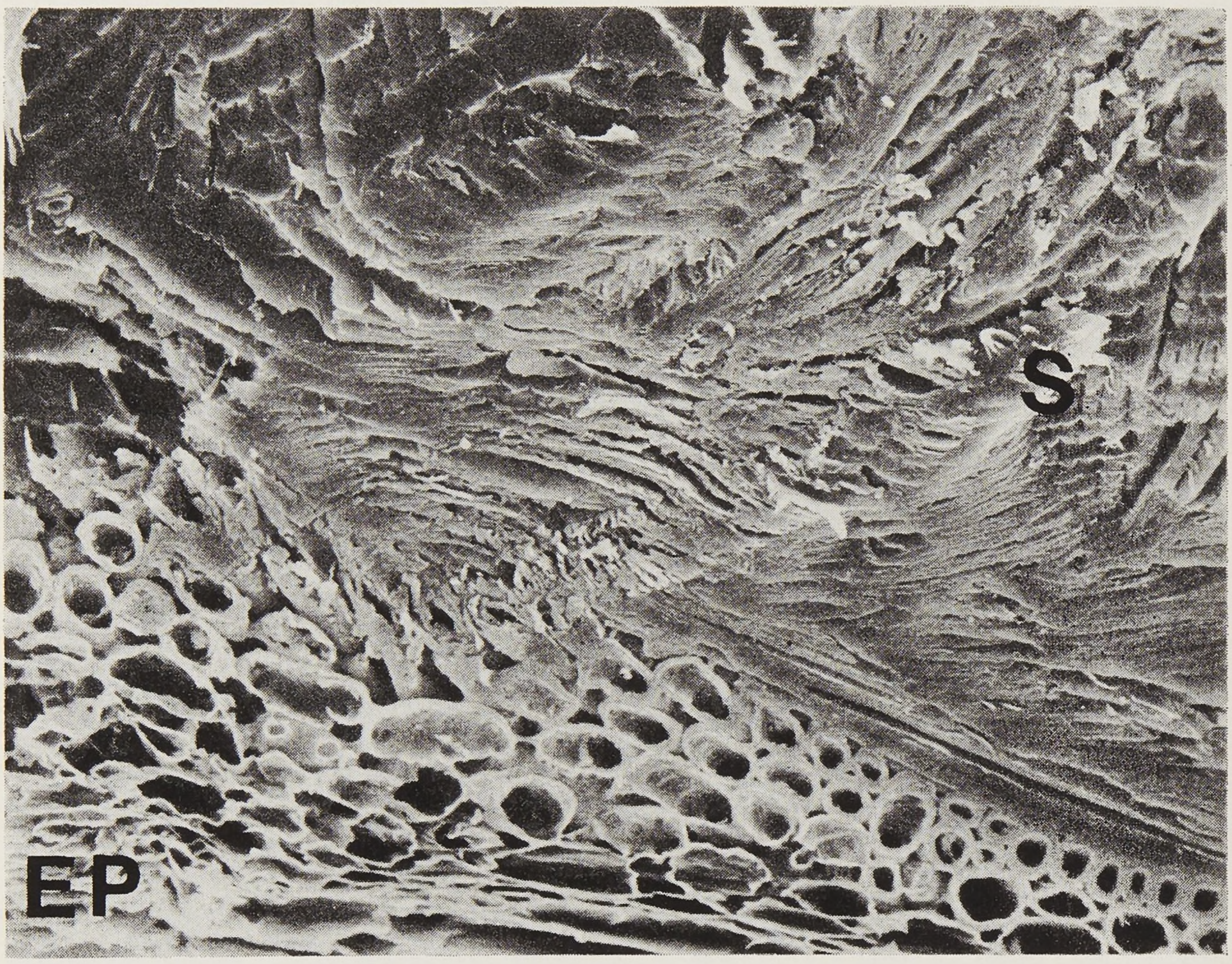


FIG. 8. — *Cross section of the endocarpic region of a TP 1025 pod. S-sclerenchyma band, EP-endocarpic parenchyma.*

before selection for an acceptable peanut resistant to penetration by the pod rotting and mycotoxin producing fungi can be obtained. Considerable progress has been made characterizing pod and testa tissues of resistant genotypes. Screening efforts are underway to select additional lines with superior pod and testa characteristics.

Reçu pour publication en juillet 1977.

Résumé

Réduction de la contamination mycotoxines des arachides par développement de variétés résistantes

La sélection de variétés résistantes à la contamination par *A. flavus* est basée sur l'examen de perméabilité de la pellicule de la graine. La structure de cette pellicule a été étudiée au microscope électronique à balayage. Deux souches PI 337394 et PI 337409 contiennent une couche cireuse constituant une barrière étanche à la pénétration d'*A. flavus*.

Mots clés : *Mycotoxines, arachides, variétés résistantes.*

Acknowledgements

This investigation was supported by U.S. Department of Agriculture Cooperative Agreement No. PSRD 11,220, a grant from the Texas Peanut Producers Association and the Texas Agricultural Experiment Station.

References

(1) Dickens J. W., Pattee H. E., 1966. The effect of time, temperature and moisture on aflatoxin production in peanuts inoculated with toxic strain of *Aspergillus flavus*. *Trop. Sci.*, **8**, 11-22.

(2) Diener U. L., 1965. Relation of *Aspergillus flavus* invasion to maturity of peanuts at harvest. *J. Alabama Acad. Sci.*, **36**, 21.

(3) Ketring D. L., Benedict C. R., Yeager M., 1976. Growing season and location effects on water uptake and drying rates of peanut seeds (*Arachis hypogaea* L.) from genotypes resistant and susceptible to invasion by *Aspergillus flavus* Lk. e. Fr. *Agron. Journal.*, **68**, 661-665.

(4) McDonald D., Harkness C., 1964. Growth of *Aspergillus flavus* and production of aflatoxin in groundnuts. *IV. Crop Sci.*, **6**, 12-27.

(5) Mixon A. C., Rogers K. M., 1975. Factors affecting *Aspergillus flavus* Lk. ex Fr. colonization of resistant and susceptible genotypes of *Arachis hypogea* L. *Peanut Sci.*, **2**, 18-22.

(6) Mixon A. C., Rogers K. M., 1973. Peanut accessions resistant to seed infection by *Aspergillus flavus*. *Agron. J.*, **65**, 560-562.

(7) Pettit R. E., Taber R. A., Ives P. J., Thurston E. L., Smith O. D., Boswell T. E., 1976. Peanut pods: Structural differences among cultivars as revealed by scanning electron microscopy. *In:* Proceedings of Scanning Electron Microscopy Workshop, Om Johari (ed.). Vol. II, p. 506-512.

(8) Pettit R. E., Taber R. A., Schroeder H. W., Harrison A. L., 1971. Influence of fungicides and irrigation practice on aflatoxin in peanuts before digging. *Appl. Microbiol.*, **22**, 629-634.

(9) Taber R. A., Pettit R. E., Benedict C. R., Dieckert J. W., Ketring D. L., 1973. Comparison of *Aspergillus flavus* tolerant and susceptible peanut lines. I. Light microscope investigation. *J. Amer. Peanut Res. Educ. Assoc.*, **5**, 206.

Ann. Technol. Agri., 1977, **27** (3), 353-366.

Genetically determined structural parameters of the seed coat affecting the colonization of peanut seeds by aflatoxin producing Aspergilli (*)

Marilyne C. DIECKERT * et J. W. DIECKERT **

* *Texas A. M. Research Foundation, College Station, Texas, U.S.A.*

** *Department of Biochemistry and Biophysics, Texas A M University, College Station, Texas, U.S.A.*

Summary

One of the peanut industry's greatest problems is loss of seed through contamination by various Aspergilli. Many researchers have investigated factors contributing to the susceptibility of peanuts to these aflatoxin-producing fungi. Certain strains of peanut have been found to show resistance to the fungus, while other strains are known to be highly susceptible. Comparative studies have been made between resistant and susceptible strains, with attempts to correlate differences in size, moisture content, age, seed coat thickness, and epidermal surface characteristics with degrees of susceptibility or resistance. In this study two resistant and two susceptible strains were researched by transmission electron microscopy. Striking differences in packing arrangement of the collapsed cells of the mature peanut testa were discovered upon comparison. Both resistant strains showed a well-ordered linear system of tightly packed cell walls in the mid-region of the mature testa. In contrast, both susceptible strains revealed disorder in the arrangement of cell walls in the same region, with resulting open lacunae through which the mold easily spread upon challenge by *Aspergillus parasiticus*. This structural difference, shown in the electron micrographs, is proposed by the authors to be an inherited trait which could become a basis for procedures designed to screen different strains of peanut for resistance or susceptibility to infection by aflatoxin-producing Aspergilli.

Key-words: *Peanut, Aflatoxin-Aspergilli, seed coat genetical structure.*

(*) III[e] Symposium International I.U.P.A.C. sur les Mycotoxines dans l'Alimentation. Paris, 16-18 septembre 1976.

Introduction

Of great concern to the industry is the problem of contamination of peanut seeds by various mycotoxins, the most prominent of which are the aflatoxins produced by various species in the genus Aspergillus. The contamination problem is extremely complex, since mold infection is known to occur at different stages in the development of the peanut fruit as well as at different points in the storage and processing systems. The presence of Aspergillus infection in freshly dug peanuts (DICKENS and SATTERWHITE, 1973) would seem to indicate that factors contributing to the problem are beyond the control of the processor. Various researchers have noted that any physical or mechanical damage to the peanut hull favors fungal invasion. This includes the shriveling which may occur if the peanut is immature when harvested, difficulties in storage and processing, and damage by insects (DICKENS and SATTERWHITE, 1973).

No single factor is responsible for the invasion of the fungal hyphae. Certainly, hull penetration is not the prime cause, for certain strains of peanut are notably resistant to infection even after being shelled (MIXON and ROGERS, 1973). The scanning electron microscope has been utilized in a study of wax accumulations on the surface of the testa, or seed coat (LA PRADE *et al.*, 1973). Differences in the amounts of wax on the surface of the testa were correlated with degrees of mold susceptibility in various strains of peanut. Investigations have been made concerning a possible correlation between the sizes of peanut kernels and susceptibility to aflatoxin-producing molds (BLANKENSHIP *et al.*, 1973). Screening procedures showed that the larger, mature peanut kernels had a substantially lower aflatoxin contamination than the smaller kernels.

In recent years various researchers have studied the peanut testa with increased interest. In 1973 the work of Mixon and Rogers showed that certain varieties of peanuts are more resistant than others to invasion by aflatoxin-producing strains of Aspergillus, and the results gave some indication that the resistance might be related to the seed coat (MIXON and ROGERS, 1973). Benedict found that all P. I. seeds became equally susceptible by *Aspergillus parasiticus* upon removal of seed coats (BENEDICT *et al.*, 1973). Taber and Pettit's work entailed a light microscopic investigation of the morphological differences between varieties of peanut, with special attention to the seed coat (TABER *et al.*, 1973). Structural differences were found between the strains of Mixon's susceptible and resistant genotypes which included the size and arrangement of cell layers in the testa. Recently Mixon completed a detailed study of susceptible and resistant strains previously studied, with reference to initial seed moisture, incubation and storage time, seed maturity, harvest time and seed handling (MIXON and ROGERS, 1975). The results showed that resistance to Aspergillus invasion in resistant genotypes having intact seed coats was greater than for the susceptible genotypes used in the study. Preliminary work showed that removal or damaging of the seed coats of resistant genotypes made them susceptible to Aspergillus colonization. Also, it was found that immature and over-mature seed of the two resistant genotypes were more susceptible to colonization by Aspergillus. A preliminary electron microscopical study of testa structure in two P.I. strains of peanut (DIECKERT *et al.*, 1973) revealed some basic differences in susceptible and resistant seed coats. This prompted further study in order to test the validity of the findings. The present study was designed to investigate four P.I. strains, with multiple replications, using transmission electron microscopy.

Methods and materials

Peanuts obtained from Aubrey C. MIXON (*) representing strains P.I. 343360 and P.I. 343326 (susceptible varieties) and P.I. 337394 and P.I. 343409 (resistant varieties) were inoculated by Ruth TABER (**) with spores of *Aspergillus parasiticus*. Suitable uninoculated controls were incubated under identical conditions of temperature (70^0 F.) and moisture content (23.5 p. 100-27.5 p. 100). Forty days later, tissue cubes 1 mm square were dissected from the peanut cotyledons, leaving the testa affixed to the outer side. The tissue cubes were prefixed in a solution of 2 p. 100 glutaraldehyde and 2 p. 100 osmium tetroxide, after Falk's method (FALK, 1969). Sodium phosphate buffer (0.05 M), pH 7.0-7.2, was used in the fixative solutions and washes. After a 30-minute fixation at 0-4 ^{0}C, the prefixative solution was extracted by cold sodium phosphate buffer. All tissue was then post-fixed for 3 hours in 2 p. 100 osmium tetroxide at 0-4 ^{0}C. After repeated washings with cold distilled water, the tissue was dehydrated stepwise in an acetone series and embedded in Spurr's low viscosity resin mixture (SPURR, 1969). The embedding materials and fixatives were obtained from Polysciences, Inc., Warrington, Pennsylvania, U.S.A. Chemicals used in the buffers were obtained from Fisher Chemicals, Houston, Texas, U.S.A. Sections were cut with a Dupont diamond knife on an LKB Ultratome III and stained with magnesium uranyl acetate and lead citrate. Electron micrographs were prepared with a Hitachi HU11A transmission electron microscope.

Results

This study compared two resistant strains of peanut, P.I. 337394 and P.I. 343409, and two susceptible strains, P.I. 343360 and P.I. 343326. Tissue from normal unchallenged and challenged mature peanuts of the above four strains were fixed and embedded as described under « Methods and Materials ».

Figure la shows a cross section through the mid-region of a normal unchallenged peanut testa from a peanut of the resistant strain, P.I. 337394. The mature testa displays tightly packed layers of collapsed cell walls in the palisade mid-layer, with few empty spaces. Figure 1*b* reveals the extent of Aspergillus invasion into the testa of the resistant peanut after the challenge. It should be pointed out that no strain has been declared 100 p. 100 resistant to infection. Rather, it is a matter of degree. It is obvious that the tightly packed cell wall material remained unpenetrated by the fungal hyphae. The only hyphae observed are seen in spaces near the epidermal layer.

In striking contrast, a cross section through the mid-section of a normal unchallenged peanut testa from the susceptible strain, P.I. 343360 (fig. 2*a*) shows invasion by Aspergillus hyphae. Here there is a lack of the tight packing observed in the resistant variety (fig. 1*a*, 1*b*). It appears that as the testa matured, the cell walls failed to collapse in an orderly way, leaving numerous lacunae throughout

(*) Dr. MIXON'S address is the U.S.D.A. Southern Regional Research Lab., Tifton, Georgia, U.S.A.

(**) Mrs. TABER is Research Associate in the laboratory of Dr. R. E. PETTIT, Plant Sciences Dept., Texas A. & M. University, College Station, Texas, U.S.A.

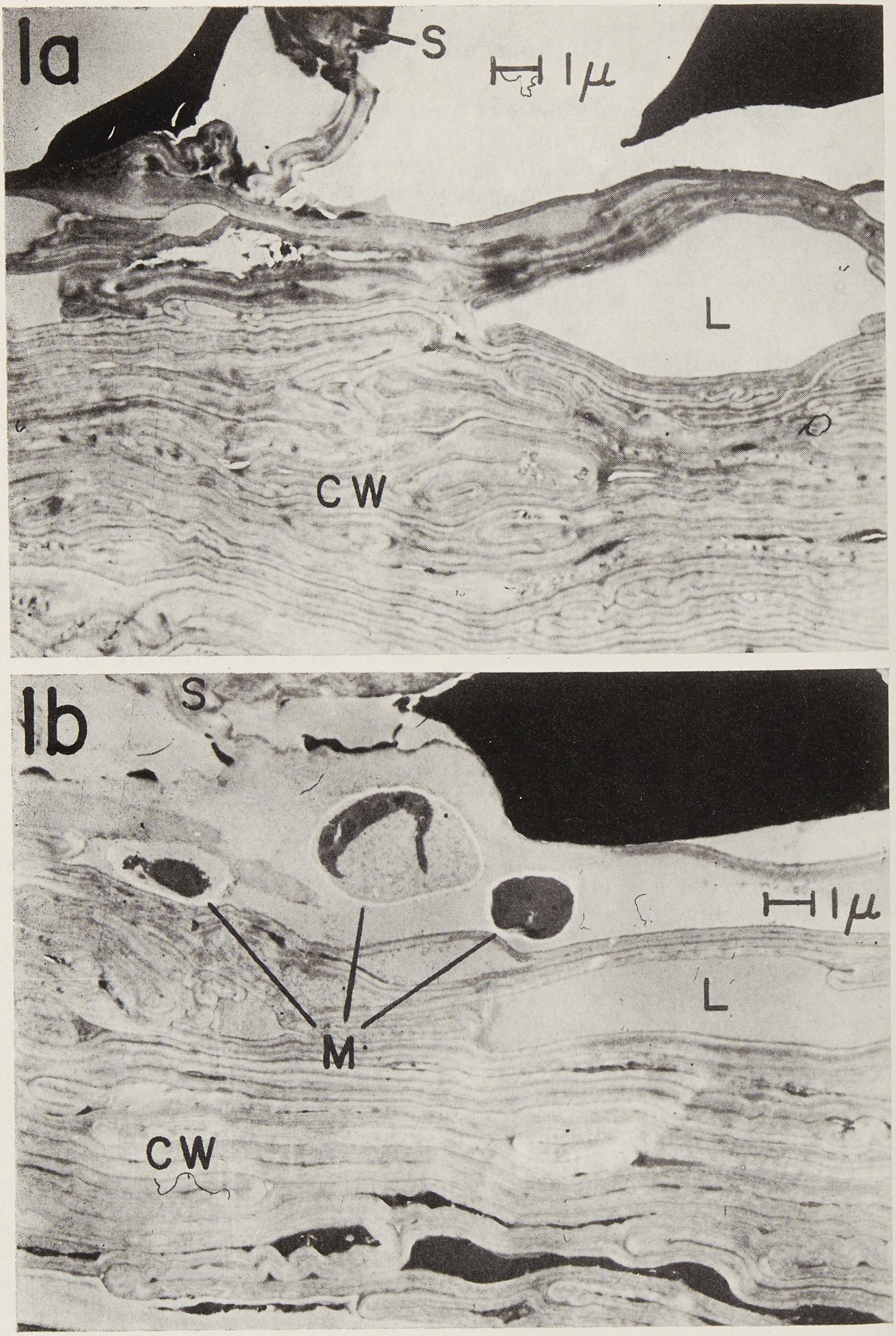


FIG. 1a, 1b.

the seed coat. This must account for the greater thickness of the testa of the susceptible strain, which was apparent upon analysis.

Electron microscopic analysis of the challenged susceptible strain shows the lacunae virtually filled with mold mycelia (fig. *2b*). The Aspergillus hyphae obviously spread throughout the testa, filling every available channel through to the cotyledonary tissue. There is indication that the hyphae digest the cell walls of the seed coat in the susceptible strains and that they do not digest the closely packed cell walls of the resistant strains. This probably implies a distinct chemical difference in the affected region of the resistant and susceptible varieties.

In figure *3a* is shown another example of the well-ordered collapsed cell walls of the normal unchallenged mature testa of a resistant strain, in this instance P.I. 343409. The closely packed cell wall material of the mid-region is shown in contrast with the outer layer which in both resistant and susceptible strains characteristically contains numerous spaces. In figure *3b* is shown a peanut testa of the same strain as shown in figure *3a* after challenge by *Aspergillus parasiticus*. While the surface and outer region showed marked fungal infection, the mid-region of the testa remained unpenetrated by the fungal hyphae, apparently due to the close packing of the collapsed well walls. Contrast the structural arrangement of the testa of this resistant strain with the loosely arranged folding layers of the testa of an unchallenged peanut of the susceptible strain, P.I. 343326, shown in figure *4a*. As a result of the disorder in the packing arrangement of the cell walls as the seed matured, this strain was found to possess a thicker testa than did the resistant strains. Again, in figure *4b* are shown the many lacunae characteristic of this susceptible strain, heavily infected by the Aspergillus mycelia.

To minimize the element of chance variations in wall packing, four replicates in each strain were studied at the electron microscope. While no strain was found to be absolute in packing character, the two resistant strains showed a

FIG. 1*a*

Peanut testa of resistant strain, P.I. 337394, unchallenged
(*Tests d'arachides d'une race résistante, P.I. 337394, non provoqués*)

A portion of the mid-region shows the characteristic close packing of collapsed cell walls (CW). Lacunae (L) are seen adjacent to the outer cell layer, which contains macrosclereids (S). X 6,125.

(Une partie de la région centrale montre le groupement serré habituel de parois cellulaires affaissées (CW). On peut voir des lacunes (L) adjacentes à la couche extérieure qui contient des macrosclereids (S). X 6,125.)

FIG. 1*b*

Peanut testa of resistant strain, P.I. 337394, challenged with Aspergillus parasiticus

(*Tests d'arachides d'une race résistante, P.I. 337394, provoqués par l'*Aspergillus parasiticus)

The mid-region of the testa shows the usual tightly packed collapsed cell walls (CW). Aspergillus mycelia (M) are seen only in the lacunae (L) in the outer layer of the testa. Part of a macrosclereid (S) is seen at the top of the photograph. × 6,125.

(La région centrale des tests montre le groupement serré habituel des parois cellulaires (CW). Des Aspergillus mycelia (M) sont seulement vus dans les lacunes de la couche extérieure des tests. On peut voir un macrosclereid (S) en haut de la photo. × 6,125.)

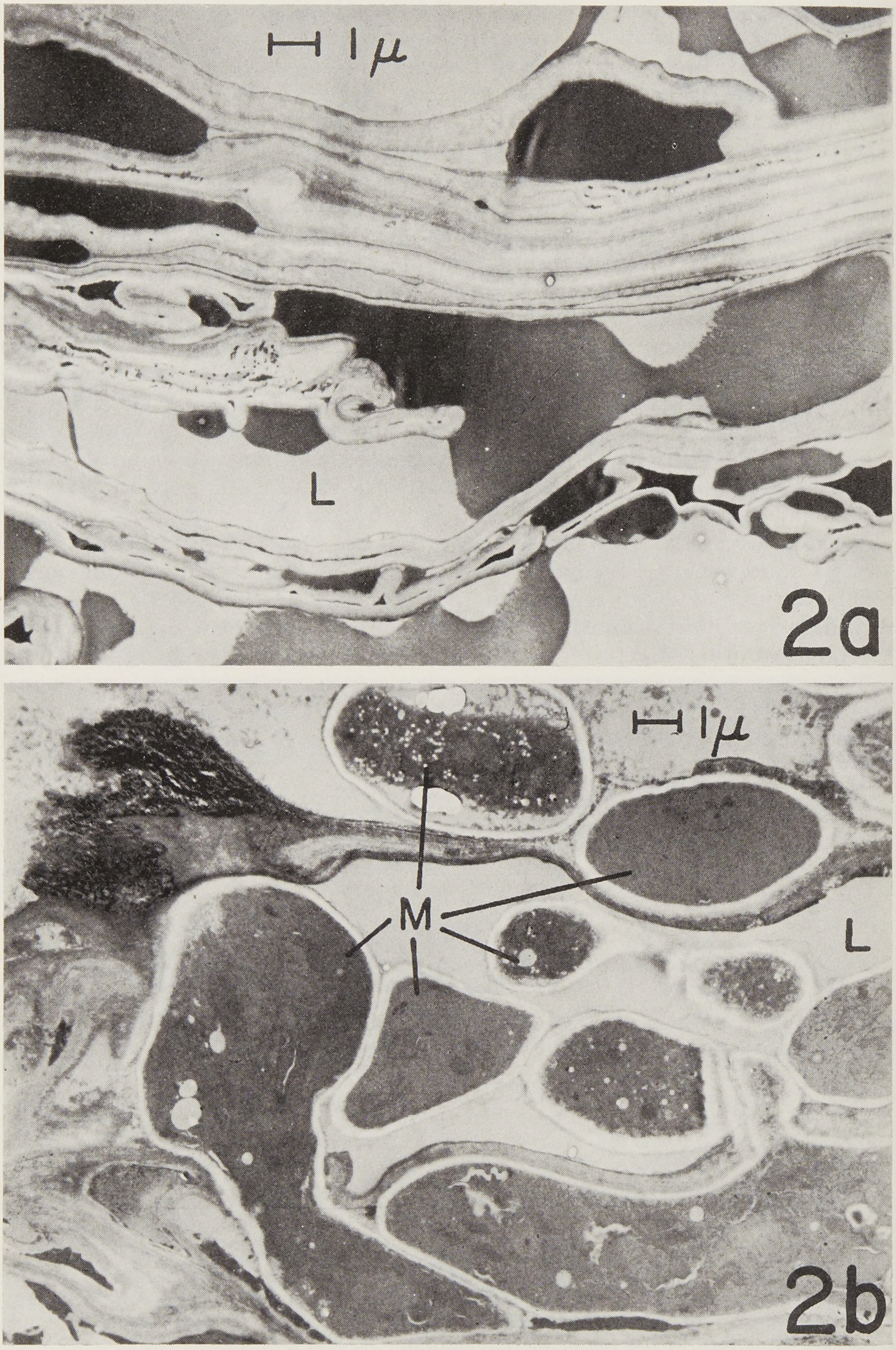


FIG. 2*a*, 2*b*.

strong dominance of the well-ordered packing arrangement of the cell walls in the mid-region of the mature testa. In striking contrast, the two susceptible strains generally displayed disordered, randomly collapsed cells, with orderly packing evident in only a few small areas. The arrangement of the wall material was patchy and discontinuous, so that no continuity of protective layering was possible. The many lacunae formed by incomplete cell collapse left virtual networks of spaces through which the mold mycelia spread. Presumably, the hyphae secreted enzymes that digested cell walls of the susceptible varieties, thereby providing tunnels for the hyphae.

Discussion and conclusions

The testa of the mature peanut consists of three primary layers. The epidermis differentiates as a mechanically protective tissue complete with cutinized outer layer covering a layer of macrosclereids. The middle region consists of elongated, collapsed, empty parenchyma cells with thin cell walls which may be closely appressed into packed layers, or which may have large empty intercellular spaces. The inner region adjacent to the parenchyma cells consists of a single layer of long symmetrical thin walled cells called « inner epidermis » (Woodruff and Leahy, 1940). This layer is bordered on the innermost side by a layer of thick-walled cells called « perisperm » (Winton, 1904) which serves to hold the seed coat and embryo together during growth.

As the seed matures, the testa is compressed by the developing embryo. The internal structure becomes drastically altered as the cells die during the progressive desiccation of the seed. In the process, the cell walls of the mid-region of the testa, ideally, compress together in tightly-packed well-ordered layers, forming a dense, structural protective barrier for the seed. This condition was evident in the two resistant strains of peanut, P.I. 337394 and P.I. 343409, used in this study. In the susceptible strains of peanut studied (P.I. 343360 and P.I.

Fig. 2*a*

Peanut testa of susceptible strain, P.I. 343360, Unchallenged
(*Tests d'arachides d'une race susceptible. P.I. 343360, non provoqués*)

The mid-region shows disorder in the arrangement of cell walls, with many open lacunae (L) throughout the region. × 6,125.

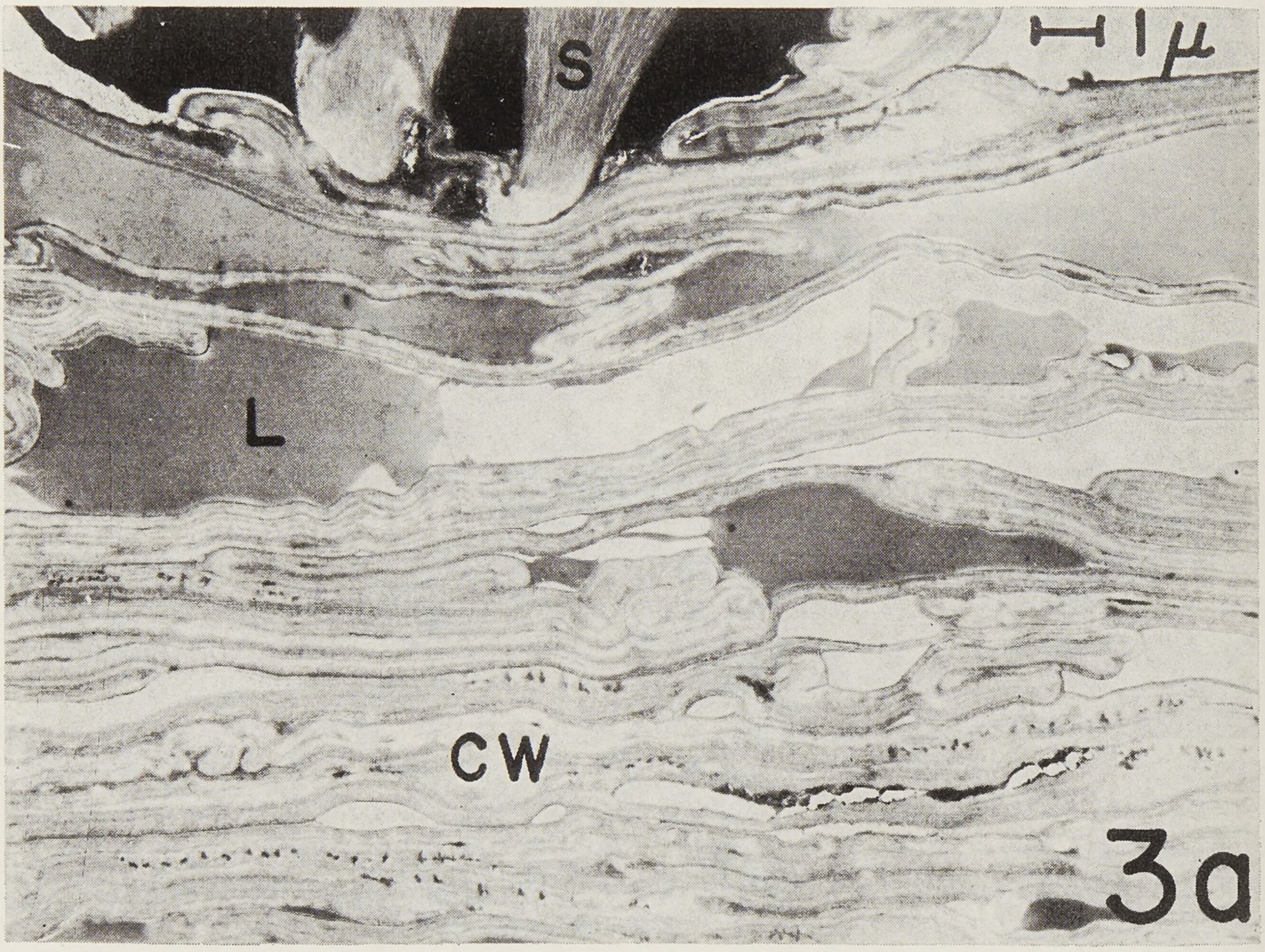
(La région centrale montre un désordre dans l'arrangement des parois cellulaires, avec beaucoup de lacunes ouvertes dans toute la région. × 6,125.)

Fig. 2*b*

Peanut testa of susceptible strain, P.I. 343360, challenged with Aspergillus parasiticus.
(*Tests d'arachides d'une race susceptible, P.I. 343360, provoqués par l'*Aspergillus parasiticus.)

The open network of empty lacunae (L) throughout the mid-region is heavily infected with the Aspergillus mycelia (M). × 6,125.

(Le réseau ouvert de lacunes vides à travers la région centrale, est profondément infectée par les Aspergillus mycelia (M). × 6,125.)



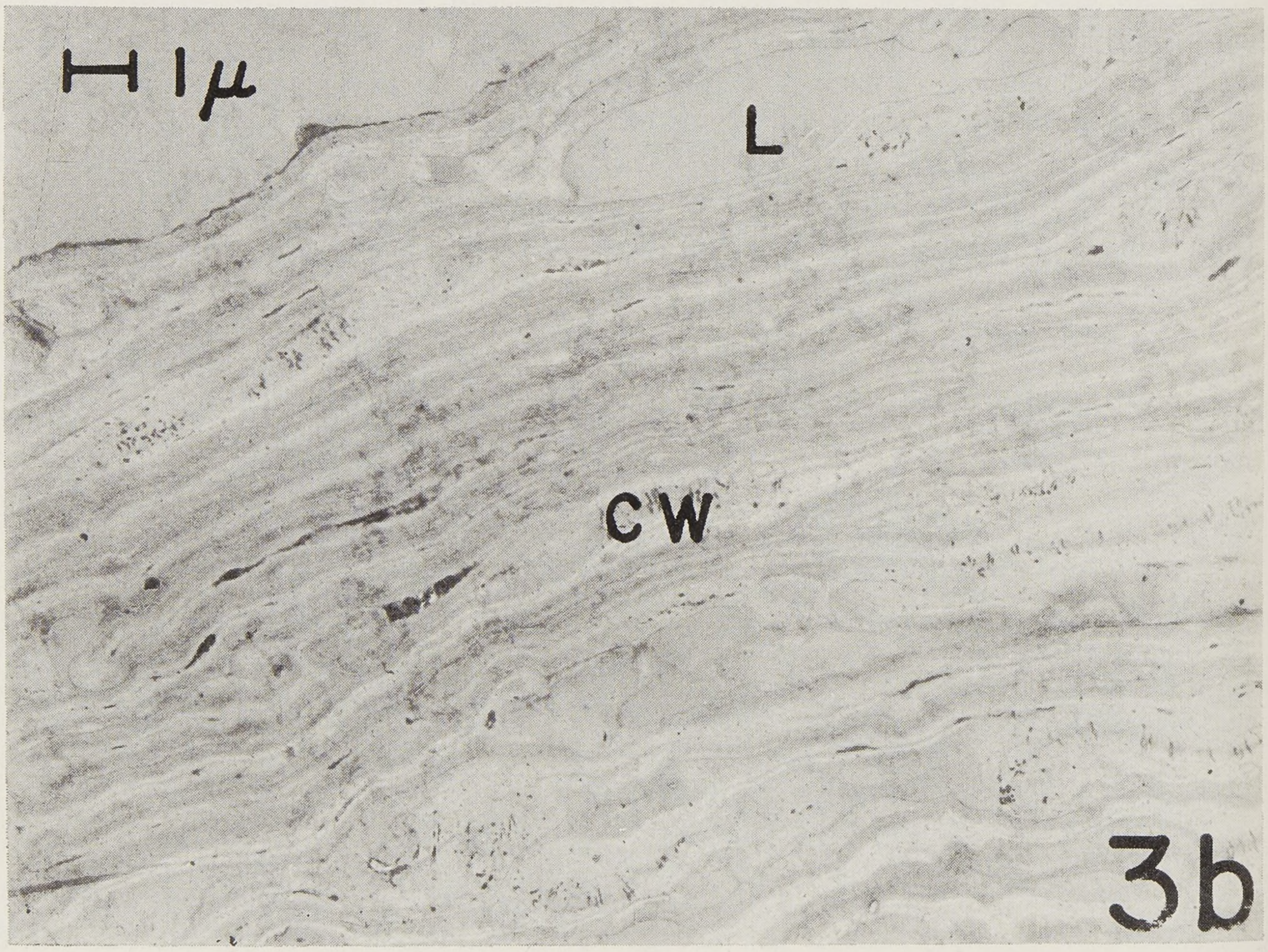


FIG. 3*a*, 3*b*.

343326) an imperfect disordered packing of cell walls was generally the rule, resulting in large empty lacunae with no continuous barrier of linearly close-packed cell walls in the mid-region of the testa. Such a random system of open spaces throughout the peanut testa in the susceptible varieties offered little or no resistance to the penetration by hyphae of *Aspergillus parasiticus*. Apparently, some genetic lesion in the susceptible varieties interrupts the orderly packing process.

In the resistant strains the occasional occurrence of lacunae caused by imperfect cell collapse did little to weaken the peanuts' resistance to the fungus, since a thick continuous layering was still in evidence in the mid-region of the testa. The fungal hyphae were able to invade the spaces near the outer layer of the testa, but only so far; the structural barrier seen in the mid-regions stopped further growth and thus the cotyledon remained protected. If occasional spaces were seen near the inner epidermis of the resistant testa, they remained empty, being protected by the layers of packed cell wall material separating them from the invading fungal hyphae.

La Prade's work (LA PRADE, *et al.*, 1973), correlating wax accumulations on the testa with susceptibility versus resistance, was not verifield by our research, since all challenged peanuts showed marked fungal invasion in the outer layer of the testa. It proved to be a general case that all four strains possessed many open spaces in the outer layer near and around the cone-shaped macrosclereids. When challenged, susceptible and resistant strains alike demonstrated heavy mold growth in this area. The outer epidermis offered little or no resistance to the Aspergillus hyphae in spite of the outer layer of cutin and dense macrosclereids. Either physical damage or, perhaps, exzymatic action on the part of the fungus

FIG. 3*a*

Peanut testa of resistant strain, P.I. 343409, unchallenged
(*Testa d'arachides d'une race résistante, P.I. 343409, non provoqués.*)

The outer region shows macrosclereids (S) and many lacunae (L). The lower portion of the electron micrograph shows the tightly packed cell walls (CW) and the gradation in packing between the mid and outer regions. × 6,125.

(La région extérieure montre des macrosclereids (S) et beaucoup de lacunes. La partie inférieure du micrograph électronique montre le groupement serre des parois cellulaires et la gradation dans le groupement entre la région centrale et la région extérieure. × 6,125.)

FIG. 3*b*

Peanut testa of resistant strain, P.I. 343409, challenged with Aspergillus parasiticus
(*Tests d'arachides d'une race résistante, P.I. 343409, provoqués par l'*Aspergillus parasiticus.)

This electron micrograph shows the characteristic tight packing of the collapsed cell walls (CW) in the mid-region of the testa, with a few intervening lacunae (L) in evidence. There is no visual evidence of fungal infection in this region, though mycelia were seen in the outer layer of this specimen. × 6,125.

(Ce micrograph électronique montre le groupement serré caractéristique des parois cellulaires affaissées dans la région centrale des tests, avec quelques lacunes s'interposant en évidence. Il n'y a pas d'évidence visuelle d'une infection de champignon dans cette région, quoiqu'on ait pu voir des mycelia dans la couche extérieure de ce spécimen. × 6,125.)

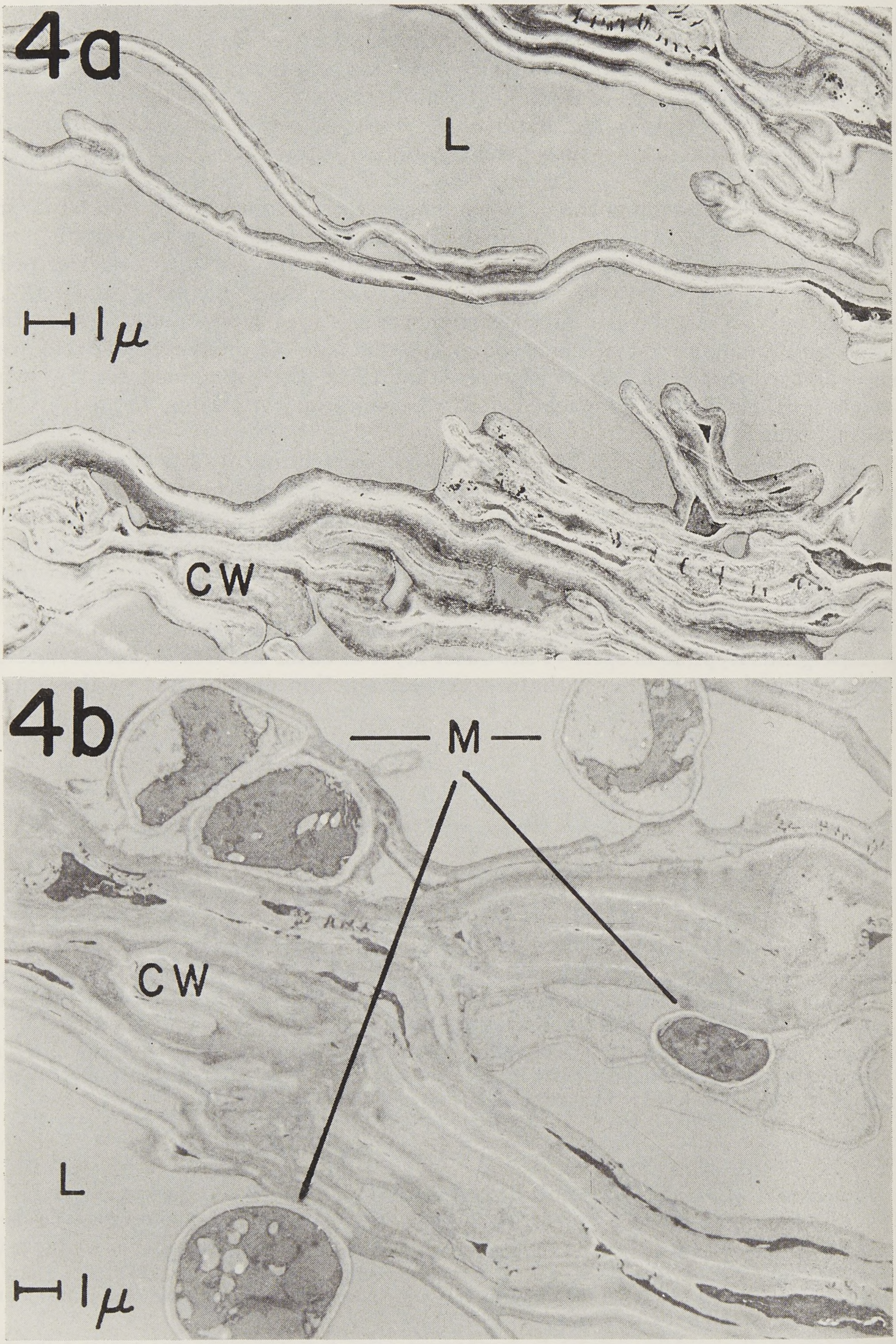


Fig. 4a, 4b.

resulted in easy access by the mold to this area. The real protective barrier was shown consistently to be the mid-region of the seed coat, or testa.

It is our belief that the internal structure of the testa of the mature peanut, with accompanying variations in composition of the cell walls, may be genetically determined, so that the degree of well-ordered cell wall packing in the testa is influenced by inherited factors.

The peanut has been researched extensively to ascertain the inheritance of various characters. Patel studied a hundred varieties of peanut, determining the following inherited characters: chlorophyll deficiency, testa colour, pubescence, growth habit, branching, and anthocyanin pigment in the testa (PATEL *et al.*, 1936). In a genetic study of seed coat thickness in *Vigna unguiculata* (*L.*) *Walp.*, Ojomo used four inbred lines that bred true for seed coat thickness, finding that the inheritance of parental seed coat thickness in Vigna was controlled by two major gene pairs with segregating rations of 9:6:1. (OJOMO, 1972).

In our research we found a distinct correlation between thickness of the testa and internal cellular arrangement. The resistant varieties of peanut showed consistently thinner seed coats than the susceptible varieties. In our electron micrographs, all done at identical magnifications, it is apparent that the loose arrangement of the cellular wall material resulted in seed coats which were two to three times as thick as those seed coats having tightly packed cell walls.

The data from this research seem to substantiate the hypothesis that the testa of the peanut forms a structural barrier to the invasion of aflatoxin-producing fungal hyphae. In addition it seems probable that the process of formation of protective coverings is partly under genetic control and that variations in the genetic determinants for certain errors in the process result in the tendency of the various peanut strains to form « good » or « bad » packing arrangements and render the seeds either susceptible or resistant.

It seems likely that those peanut strains whose seed coats demonstrate an inherent ability to form tightly packed layers of cell wall material at maturity have the best chance to be resistant to attack by fungi. This assumes that the substances in and between the packed cell walls that appear to resist digestion

FIG. 4*a*

Peanut testa of susceptible strain, P.I. 343326, unchallenged
(*Tests d'arachides d'une race susceptible, P.I. 343326, non provoqués*)

The mid-region of the uninfected peanut testa shows a disordered packing arrangement of cell walls (CW) with many open lacunae (L). × 6,125.

(La région centrale des tests d'arachides non infectés montre un groupement désordonné dans l'arrangement des parois cellulaires (CW) avec beaucoup de lacunes ouvertes (L). × 6,125.)

FIG. 4*b*

Peanut testa of susceptible strain, P.I. 343326, challenged with Aspergillus parasiticus
(*Tests d'arachides d'une race susceptible, P.I. 343326, provoqués par l'*Aspergillus parasiticus)

The mid-region is filled with many Aspergillus mycelia (M) growing in the open lacunae (L) characteristic of this susceptible strain. × 6,125.

(La région centrale est remplie de beaucoup d'Aspergillus mycelia (M) poussant dans les lacunes ouvertes (L) caractéristiques pour cette race susceptible. × 6,125.)

by the hyphal enzymes are also partly responsible for the cementing effect of the tightly packed cell walls. The varieties which have large open intracellular and intercellular spaces at the conclusion of the maturation process are likely to be susceptible to attack by fungi.

Blankenship's correlation between size and susceptibility (BLANKENSHIP *et al.*, 1973) is in accordance with this hypothesis. His discovery that a larger fraction of small kernels become infected than do the larger mature kernels is consistent with the idea of the need for well-ordered packing of collapsed cell walls for resistance. The smaller nuts are probably immature. The cells of the seed coat of an immature peanut were killed before the cells were able to transform from living, metabolically active cells to the dead, thoroughly collapsed and impregnated cells of the mature seed. This agrees with and explains the findings of Mixon (MIXON and ROGERS, 1975).

Processing and storage conditions would assuredly have a direct bearing on maintaining the structural integrity of the seed coat; however, the crux of the problem, as bourne out by this research, appears to be in possible genetically determined variations inherent in the developmental pattern of the testa of different varieties of peanut.

The many research efforts linking the cause of Aspergillus infection in peanuts with either soils (PETTIT *et al.*, 1973), insect damage (DICKENS and SATTERWHITE, 1973), kernel size (BLANKENSHIP *et al.*, 1973), handling and processing (DICKENS, 1975), seed moisture (MIXON and ROGERS, 1975), or pod structure (PETTIT *et al.*, 1975) demonstrate that all these items and conditions have some bearing on Aspergillus infection. However, these studies all provide the clues which point to a more basic underlying problem, hitherto unsolved, on which the results of this work should shed some light—the phenomenon of distinct genetically determined differences in seed coat structure and composition.

Work presented here suggests that electron microscopical analysis could be employed routinely to detect likely resistant strains of peanut for cultivation. It seems feasible to use transmission electron microscopy in a standardized screening process to identify those strains of peanut having the greatest chance of resistance to the various aflatoxin-producing molds. Within a week's span fresh material from a single strain of peanut could be fixed, embedded, sectioned and photographed at the electron microscope to yield definitive visual information from which to judge the degree of resistance or susceptibility.

Reçu pour publication en juillet 1977.

Résumé

Paramètres structuraux de l'enveloppe génétiquement déterminés affectant la contamination des graines d'arachide par des Aspergilli producteurs d'Aflatoxine

Un des problèmes les plus importants dans l'industrie des arachides, est la perte en graines résultant d'une contamination par divers Aspergillii. De nombreuses recherches ont été faites pour déterminer les facteurs conditionnant la susceptibilité des arachides à ces champignons producteurs d'aflatoxine. On a constaté que certaines souches d'arachides sont résistantes, alors que d'autres sont extrêmement sensibles. Des études comparatives ont été faites entre les souches ésistantes et les souches sensibles, en essayant de relier des différences de taille, de teneur en

eau, d'âge, d'épaisseur de l'enveloppe, de caractéristiques de la surface de l'épiderme, avec le degré de sensibilité ou de résistance. Dans cette étude, on a examiné et comparé deux souches résistantes et deux souches sensibles par microscopie électronique de transmission. On a constaté ainsi des différences frappantes dans l'organisation des cellules de la testa des graines mûres. Les deux souches résistantes présentent, dans la région centrale de la testa à maturité, des parois cellulaires ordonnées de façon linéaire. Au contraire les deux races sensibles présentent, dans la même région, une organisation désordonnée des parois cellulaires, entraînant la formation de lacunes par lesquelles la moisissure produite par *Aspergillus parasiticus* se propage facilement.

Cette différence de structure, démontrée par les micrographies, est considérée par les auteurs comme une caractéristique héréditaire qui pourrait être le point de départ de procédés nouveaux pour différencier les souches d'arachides résistantes ou sensibles à la contamination par les Aspergilli producteurs d'aflatoxine.

Mots clés : *Arachide, Aflatoxine, Aspergilli, enveloppe de la graine, structure génétique.*

Acknowledgements

The authors express their thanks to Aubrey C. Mixon for the peanuts used in the study and to Ruth A. Taber and Robert E. Pettit for their help in the inoculation procedures.

French translations were done by Monique Koepke.

This research was supported by U.S.D.A. Contract P.S.R.D.-11,220 and is currently supported by Hatch Project 1306 with the Texas Agricultural Experiment Station.

References

Benedict C. R., Ketring D. L., Pettit R. E. and Dieckert J. W., 1973. Comparison of *Aspergillus flavus* tolerant and susceptible peanut lines. III. Physiological investigations. *J. Amer. Peanut Res. and Educ. Ass.*, **5**, 206 (Abstract).

Blankenship P. D., Holaday C. E. and Butler J. L., 1973. Some results concerning the occurrence of aflatoxin in selected sizes of peanut kernels. *J. Amer. Peanut Res. and Educ. Ass.*, **5** (1), 160-163.

Dickens J. W., 1975. Some approaches to a solution of the aflatoxin problem through research and education. *J. Amer. Peanut Res. and Educ. Ass.*, **7** (1), 54-61.

Dickens J. W. and Satterwhite J. B., 1973. Aflatoxin-contaminated peanuts produced on North Carolina farms in 1968. *J. Amer. Peanut Res. and Educ. Ass.*, **5** (1), 48-58.

Dieckert J. W., Dieckert M. C., Pettit R. E., Benedict C. R., Ketring D. L., 1973. Comparison of *Aspergillus flavus* tolerant and susceptible peanut lines. II. Electron microscopy. *J. Amer. Peanut Res. and Educ. Ass.*, **5** (1), 207 (Abstract).

Falk H., 1969. Rough thylakoids: polysomes attached to chloroplast membranes. *J. Cell Biol.*, **42** (2), 582-587.

La Prade J. C., Bartz J. A., Norden A. J., Demuynk T. J., 1973. Correlation of peanut seed-coat wax accumulations with tolerance to colonization by *Aspergillus flavus*. *J. Amer. Peanut Res. and Educ. Ass.*, **5** (1), 89-94.

Mixon A. C. and Rogers K. M., 1973. Peanut accessions resistant to seed infection by *Aspergillus flavus*. *Agron. J.*, **65** (4), 560-562.

Mixon A. C. and Rogers K. M., 1975. Factors affecting *Aspergillus flavus Lk.* ex Fr. colonization of resistant and susceptible genotypes of *Arachis hypogaea* L. *Peanut Sci.*, **2** (1), 18-22.

Ojomo O. A., 1972. Inheritance of seed coat thickness in cowpeas. *J. Hered.*, **63** (3), 147-149.

Patel J. S., John C. M. and Seshadri C. R., 1936. The inheritance of characters in the ground nut *Arachis hypogaea*. *Indian Acad. Sci. Proc.*, **3** (B), 214-233.

Pettit R. E., Taber R. A. and Schroeder H. W., 1973. Prevalence of *Aspergillus flavus* in peanut soils. *J. Amer. Peanut Res. and Educ. Ass.*, **5** (1), 195 (Abstract).

Pettit R. E., Taber R. A. and Smith O. D., 1975. Structural features of peanut pods: *Arachis hypogaea* cultivars. *J. Amer. Peanut Res. and Educ. Ass.*, **7** (1), 91 (Abstract).

Spurr A. R., 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruc. Res.*, **26**, 31-43.

Taber R. A., Pettit R. E., Benedict C. R., Dieckert J. W. and Ketring D. L., 1973. Comparison of *Aspergillus flavus* tolerant and susceptible peanut lines. *J. Amer. Peanut Res. and Educ. Ass.*, **5** (1), 206 (Abstract).

Winton A. L., 1904. The anatomy of the peanut with special reference to its microscopic identification of food products. *Conn. Exp. Sta. Ann. Report.*

Woodruff J. G. and Leahy J. F., 1940. Microscopical studies of peanuts with reference to processing. *Georgia Exp. Sta. Bull.*, No. 205.

Ann. Technol. Agri., 1977, **27** (27), 367-371.

Mise au point d'un procédé industriel pour le traitement des tourteaux d'arachide contaminés par l'aflatoxine (*)

B. LESIEUR et J. COLIN

Société Lesieur Cotelle et Associés
122, Avenue du Général Leclerc, 92103 Billancourt.

Résumé

L'exposé s'attache à mettre en évidence les difficultés à résoudre ainsi que le choix à faire dans le cadre d'une solution industrielle de détoxification par ammoniation des tourteaux d'arachide contaminés par les aflatoxines.

Mots clés : *Tourteaux d'arachide, Aflatoxine, détoxification.*

Introduction

Différents chercheurs éminents et notamment le Prof. GOLDBLATT et ses collaborateurs ont mis en évidence la sensibilité de l'aflatoxine aux alcalis et en particulier à l'ammoniac.

Le principe du traitement étant tracé il fallait déterminer les conditions industrielles d'application, établir des bilans pondéraux, choisir un processus d'application et les matériels susceptibles de convenir.

Des essais en laboratoire et sur pilote ont été menés pendant plusieurs années et ont permis de mettre au point une technologie adaptée aux tourteaux d'arachide dont la manipulation est toujours délicate.

Ces données de base déjà bien connues sont les suivantes :

1. Utilisation de l'ammoniac sous pression 0,5 à 2 bar.

2. Conditions minimales de température d'humidité et de temps de séjour

(*) III[e] Symposium International I.U.P.A.C. sur les Mycotoxines dans l'Alimentation. Paris, 16-18 septembre 1976.

Celles-ci pourront être définies de la façon suivante :

- Température supérieure ou égale à 80 °C.
- Teneur en eau du produit traité ⩾ 8 p. 100.
- Temps de réaction ⩾ 15 min.

Principe du procédé

Nous donnons cet exemple dans le cadre du discontinu ou semi-continu.

1. Réchauffage, si besoin est, du tourteau pour le porter à la température désirée, supérieure ou égale à 80 °C. Pour cela on utilise des appareils bien connus dans l'industrie huilière : chauffoir ou encore un désolvantiseur toaster.

2. Humidification pour obtenir le degré d'humidité voulu. Cette opération délicate se fait dans un réacteur de type spécial. Nous y reviendrons plus loin.

3. Dans le même appareil que précédemment, mise en pression par le gaz d'ammoniac pour une pression inférieure ou égale à 2 bars (relatifs), celle-ci étant maintenue pour un temps de réaction compris entre 15 et 30 min.

4. Décompression du réacteur. Les gaz d'ammoniac passent dans un laveur humide et dans une tour d'absorption à l'eau. L'eau ammoniacale obtenue sera réutilisée pour l'humidification du tourteau en début d'opération.

5. Élimination de l'ammoniac contenu dans le tourteau. A ce niveau, l'opération redevient continue. Cette opération ou désorisation s'obtient dans un appareil spécial prévu en aval du réacteur où le tourteau est maintenu en mouvement, tout en étant chauffé. La pression est inférieure à la pression atmosphérique.

Les gaz récupérés riches en eau et en ammoniac sont dirigés sur l'installation de récupération citée plus haut.

Le tourteau chaud qui sort de l'installation peut être réhumidifié et pelletisé.

Bien que les conditions de réaction ne soient pas très sévères, il s'agit d'un procédé assez nouveau qui a nécessité une longue recherche afin d'en aplanir les difficultés.

Récupération de l'ammoniac gazeux

C'est le premier obstacle. Plusieurs solutions théoriques peuvent être avancées :

1. La plus simple est la transformation des excédents d'ammoniac en sulfate d'ammonium par neutralisation des gaz dans une solution d'acide sulfurique.

Pour retenir une telle solution il faut disposer d'un débouché pour le sulfate d'ammonium. Comme il s'agit d'un cas particulier, nous le citons pour mémoire.

2. Récupération des gaz qui, après lavage et déshumidification sont recomprimés et distillés pour restituer de l'ammoniac liquide. Il s'agit d'une solution très coûteuse nécessitant l'emploi d'appareils délicats.

3. Les gaz lavés sont dissous dans l'eau par l'intermédiaire d'un dispositif d'absorption de type méthodique.

L'eau ammoniacale produite sert à l'humidification du tourteau en tête de

procédé. Ce procédé a l'avantage de faciliter grandement le recyclage de l'ammoniac excédentaire. Il est toutefois nécessaire de régler la concentration de la solution ammoniacale à la sortie des laveurs de gaz de manière à ne pas avoir d'excédents et de rester dans les normes d'humidification que l'on s'est imposé.

Étant donné les courbes de solubilité en fonction de la température et la chaleur de dissolution de l'ammoniac dans l'eau, il faut prévoir une réfrigération aux différents stades du lavage.

Lors de la réaction, un apport d'ammoniac gazeux maintient la pression dans le réacteur à une valeur constante.

Cette quantité complémentaire apportée par le gaz correspond aux pertes et à l'ammoniac fixé chimiquement sur le tourteau.

Mélange avec incorporation d'eau

L'adoption du schéma nº 3 précédent implique une humidification du tourteau d'arachide qui passe de 5 à 15 p. 100 d'eau environ.

Ce choix est bénéfique sur le plan de la détoxification car il permet une destruction plus rapide de l'aflatoxine. Toutefois, il présente une difficulté de taille qui est l'incorporation d'environ 10 p. 100 d'eau à du tourteau d'arachide chaud. Toutes les personnes qui ont eu à travailler l'arachide savent les difficultés que cela représente. Cette incorporation rend le tourteau très collant et si on ne maintient pas une agitation puissante pour répartir correctement cette humidité. le produit se prend en masse et donne lieu à un produit d'une dureté extrême.

Les appareils mélangeurs à virole cylindrique équipés d'agitateurs type « soc de charrue », tournant à grande vitesse, donnent satisfaction pour des incorporations importantes d'eau.

La puissance absorbée est toutefois très élevée tant que l'eau n'est pas bien répartie et incorporée. Cette bonne répartition est une condition essentielle à la valeur du procédé.

Etanchéité des appareils

Si on envisage un procédé continu, le problème de l'étanchéité des appareils à l'ammoniac sous pression est un problème, à notre connaissance mal résolu :

Une écluse rotative appelée parfois « alvéolaire » n'est jamais totalement étanche et il faut admettre, dès le départ, un débit de fuite important. Ce phénomène est aggravé dans le temps par l'usure — le tourteau d'arachide a la réputation d'être abrasif de par sa nature et par la silice qu'il contient — il est évident qu'au bout de quelques jours de fonctionnement les jeux dus à l'usure conduiraient à des fuites inacceptables.

On peut, par contre, concevoir un système d'alimentation et de vidange du réacteur sous pression par l'intermédiaire d'un système double de vannes étanches aux gaz à fonctionnement séquentiel avec sas intermédiaire. Il y a toutefois de gros risques de bouchage et d'encrassement à ce niveau et par conséquent la fiabilité de ce système semble aléatoire.

Élimination des traces d'ammoniac libre

L'expérience a montré qu'une teneur résiduelle de 0,1 p. 100 d'ammoniac libre dans le tourteau donnait à celui-ci une odeur d'ammoniac presque insupportable. Il apparaît donc nécessaire de la réduire pour éviter tout effet d'inappétence éventuelle dans l'utilisation du tourteau traité. L'élimination de l'ammoniac se fait par chauffage avec agitation à la pression atmosphérique ou sous vide, elle est accompagnée par une élimination d'eau, ceci conduit à utiliser des moyens énergétiques importants. Si on travaille sous vide, il est possible de neutraliser les dernières traces d'ammoniac en vaporisant de l'acide acétique dans l'enceinte où se trouve le tourteau. C'est un procédé efficace et séduisant qui permet de réduire considérablement la durée d'élimination; celle-ci qui, normalement, n'est pas inférieure à 40 min sous vide, peut être de cette manière réduite à 20 ou 25 min.

Choix entre un système continu ou semi-continu

Un appareillage continu présente des avantages certains : régularité de la marche, suppression de manœuvres délicates, etc...

Les difficultés rencontrées pour maîtriser les problèmes d'étanchéité nous conduisent à penser que pour l'instant il vaut mieux recommander un système semi-continu avec une batterie de réacteurs d'ammoniation. Grâce à des trémies de stockage les processus amont et aval de ces réacteurs peuvent être continus.

Le réacteur discontinu permet, en outre, de mieux ajuster les paramètres en fonction du tourteau à traiter :

- Temps de séjour.
- Taux d'humidification.
- Pression.
- Température.

Une telle installation est, par conséquent, plus souple vis-à-vis de tous les types de tourteaux se trouvant sur le marché.

Problème de sécurité et pollution

Il s'agit essentiellement d'éviter les départs de gaz d'ammoniac dans l'atmosphère de l'atelier d'une part et à l'extérieur d'autre part. Cela implique l'étanchéité des appareils sous pression et milite en faveur du procédé discontinu pour l'instant. Par ailleurs, les gaz d'ammoniac sont aspirés et lavés à l'eau dans des appareils étanches disposés en série et l'eau circule à contre-courant.

Si on ne peut pas supprimer la présence d'ammoniac dans les gaz rejetés, on peut toutefois limiter la teneur à une valeur admissible soit 35 mg/m^3. Il est en outre possible de prévoir un lavage avec une eau acide avant rejet final ce qui solutionne totalement le problème.

Pour éviter les conséquences d'une fuite accidentelle dans l'atelier, il est nécessaire d'assurer une ventilation adéquate ainsi qu'une protection des circuits et relais électriques.

Coût d'investissement et coût d'exploitation

L'ensemble d'un atelier pouvant traiter 600 t/24 h de tourteaux par ammoniac représente un investissement lourd que l'on peut estimer compris entre 8 500 000 et 9 500 000 FF — en supposant un fournisseur d'ammoniac situé à peu de distance de l'atelier de traitement.

Le coût du traitement sans l'amortissement du matériel cité ci-dessus est estimé entre 20 et 25 F par tonne de tourteaux.

Ce prix comprend la consommation en ammoniac non fixé, la main-d'œuvre directe d'exploitation, l'entretien et l'énergie dans le cadre d'une huilerie africaine utilisant les coques d'arachides comme combustible.

Conclusion

Le traitement des tourteaux d'arachide pour éliminer l'aflatoxine suppose, à la fois un engagement financier important et une mise au point technique délicate dans de nombreux domaines.

Reçu pour publication en juillet 1977

Summary

Development of an industrial process for the treatment of peanut meals contaminated by Aflatoxine

The detoxification of aflatoxin contamined oil seed cakes by ammoniation is described. Trials in industrial scale are discussed.

Key-words: *Peanut cakes, Aflatoxine, detoxification.*

annales de technologie agricole

Trimestriel

1977

Vol. 26 - N° 4

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

Reproduction, même partielle, interdite sans autorisation des auteurs
et de l'Institut national de la Recherche agronomique
à l'exception des résumés

Ann. Technol. Agric., 1977, **26** (4), 373-418.

Présentation synthétique de diverses méthodes d'analyse de données fournies par un jury de dégustateurs

R. TOMASSONE et C. FLANZY*

Laboratoire de Biométrie,
Centre national de Recherches Zootechniques, I.N.R.A.,
78350 Jouy en Josas
**Station de Technologie des Produits végétaux,*
Centre de Recherches d'Avignon, I.N.R.A.
84140 Montfavet

Résumé

Cet article donne une vue générale des différentes méthodes d'analyse des données fournies par un jury de dégustateurs. Sur un seul critère de jugement, il rappelle les résultats classiques du test de Friedman, qu'il complète par quelques tests plus spécifiques : comparaisons multiples, ordre prédéterminé. Il montre surtout les liens profonds existant entre les différentes statistiques connues. Sur plusieurs critères, il propose l'emploi de techniques classiques d'analyse multidimensionnelle permettant de prendre en compte globalement toute l'information; à côté de méthodes bien connues comme l'analyse des composantes principales, l'analyse des correspondances et l'analyse factorielle discriminante il propose des techniques comme l'analyse procustéenne et l'analyse des coordonnées principales, mais surtout il montre les liens entre toutes les méthodes afin de fournir à l'utilisateur un choix raisonné dans la panoplie qui lui est offerte.

Mots clés : *Friedman, comparaisons multiples, corrélation de Spearman, composantes principales, correspondance, discrimination, rang, analyse organoleptique, jurys.*

I. — Introduction

Quand on réunit un jury de I dégustateurs pour goûter un nombre J de produits, le résultat de la séance de dégustation est généralement un ensemble de K tableaux rectangulaires à I lignes et à J colonnes pour chacun des K critères de dégustation choisi. Nous nous limiterons ici à l'exposé des méthodes qui permettent de traiter *des rangs*; c'est-à-dire que nous fournirons les moyens d'analyser des tableaux où chaque dégustateur choisit un ordre préférentiel des produits, donnant le rang 1 à celui qu'il préfère, 2 au suivant, et ainsi de suite jusqu'au dernier

auquel il donne, bien sûr, le rang J; éventuellement, s'il ne sait pas départager quelques produits il leur donne le même rang, affectant à chacun d'eux leur rang moyen. Nous ne parlerons pas ici d'autres techniques qui existent pour traiter les situations où nous nous trouvons en présence d'exaequo (HAJEK, 1969).

Nous voulons dans cet exposé, présenter quelques méthodes permettant d'analyser ces tableaux. Certaines sont connues, utilisées de façon assez courante comme, par exemple, celles qui relèvent des corrélations entre deux séries de rang. D'autres le sont beaucoup moins; elles sont encore « enfermées » dans des ouvrages lus par les seuls statisticiens. Or, de nombreux utilisateurs potentiels existent : ignorant ces méthodes, ils en sont réduits à perdre une information qu'ils ont eu grand-peine à recueillir. Naturellement nous irons du traitement de situations simples à celui de situations plus complexes : au paragraphe 2 nous verrons comment réaliser des analyses de variance sur les rangs dans l'équivalent d'analyses en blocs; au paragraphe 3 nous verrons comment comparer les produits de façon plus fine, et comment déterminer ceux qui sont différents de ceux qui ne le sont pas; c'est ce qu'on rencontre dans l'expérimentation classique sous le vocable de comparaisons multiples. Nous y ajouterons un résultat sur le test d'un ordre prédéterminé, ce qui peut être particulièrement intéressant lorsque sous les produits existe une « structure »; ce peut être le cas lorsqu'ils correspondent à des températures différentes de fabrication.

Au paragraphe 4 nous introduirons le coefficient de corrélation de rang de Spearman; nous verrons aussi qu'il existe entre les différentes méthodes des liens profonds qui n'apparaissent pas toujours dans les traités d'application. Les méthodes présentées dans ces trois paragraphes font partie d'un domaine particulièrement important de la statistique : *la « statistique non paramétrique »*. Il s'agit d'une branche très intéressante pour l'utilisateur pour au moins deux raisons essentielles :

- les conditions d'application sont beaucoup moins restrictives que dans la statistique paramétrique classique;
- les calculs à effectuer sont beaucoup plus simples que dans les autres branches de la statistique.

A côté de ces méthodes inférentielles, existent d'autres techniques, certes plus grossières, ou qui n'aboutissent pas obligatoirement à un test statistique, mais qui permettent d'avoir une « vision » plus géométrique des tableaux de dégustation; nous montrerons des exemples de l'emploi des méthodes d'analyse des données multidimensionnelles sur des rangs. Ces techniques font partie du domaine couramment appelé « *analyse des données* », et nous les développerons au paragraphe 5.

Afin de faciliter la compréhension de ce texte aux non statisticiens nous allons tout d'abord présenter les données expérimentales qui vont servir de support numérique à l'exposé des méthodes; il s'agit d'une expérimentation de 1973 sur des vins rouges de Carignan. Cinq vins ont été élaborés par macération carbonique avec des variantes dans la température et la durée de la première phase fermentaire; un sixième vin obtenu par vendange foulée sert de témoin.

Neuf dégustateurs confirmés devaient étudier ces six vins à l'aide des dix critères suivants :

1 : VISION

11 : Intensité colorante . 1
12 : Nuance rouge . 2

2 : OLFACTION

21 :	Intensité	3
22 :	Finesse	4

3 : GOUT-OLFACTION

31 :	Longueur de l'arôme (caudalies)	5
32 :	Finesse de l'arôme	6
33 :	Intensité des substances polyphénoliques (tanniques)	7
34 :	Harmonie générale	8

4 : CLASSEMENT SELON LA CATÉGORIE

41 :	Consommation immédiate	9
42 :	Consommation dans un an	10

Il a été demandé aux membres du jury de réaliser une analyse organoleptique objective pour chaque critère sauf pour celui d'harmonie générale (le huitième) où les préférences personnelles pouvaient apparaître. Les résultats concernant les critères de vision peuvent être comparés à des mesures spectrophotométriques; ceux concernant l'olfaction et le goût permettent de poursuivre un double objectif technologique et économique en essayant de déterminer la période de consommation des produits à leur optimum organoleptique. Le dégustateur, dans ces tests, joue le rôle d'un instrument de mesure extrêmement perfectionné mais dont la sensibilité bien supérieure à tout instrument de laboratoire peut être assez variable d'un individu à l'autre.

Avec les notations que nous avons introduites plus haut :

$$I = 9 \qquad J = 6 \qquad K = 10$$

II. — Analyse séparée sur chaque critère : tests globaux

2.1. *Analyse de variance sur les rangs*

2.1.1. *Test de Friedman.*

Si nous nous intéressons pour l'instant au premier des critères, celui d'intensité colorante, les résultats de la séance de dégustation sont ceux indiqués au tableau 1*a*; la notation symbolique du tableau 1*b* permet de définir le rang R_{ij} d'un traitement j (ici d'un vin) dans un bloc i (ici un dégustateur). Pour un bloc i donné les quantités R_{i1}, R_{i2}, ... R_{iJ} sont une permutation des J premiers entiers dans le cas où il n'y a pas d'exaequo; naturellement leur somme est constante; par contre les sommes des colonnes sont affectées par les différences attribuées aux traitements dans les différents blocs. Si les traitements étaient tous identiques, les sommes R_1, R_2, ... R_j... devraient être égales à la valeur moyenne $I(J + 1)/2$; il est donc naturel de choisir comme statistique la quantité :

$$S = \sum_{j=1}^{j=J} (R_j - I(J + 1)/2)^2 \tag{2.1}$$

TABLEAU 1*a*

Rangs d'intensité colorante

Vin / Dégustateur	A (1)	B (2)	C (3)	D (4)	E (5)	F (6)	Somme
1	6	3	2	1	4	5	21
2	4,5	4,5	1	2	6	3	21
3	5	3,5	1	2	6	3,5	21
4	6	4	2	1	5	3	21
5	4,5	3	2	1	6	4,5	21
6	5	4	1	2	6	3	21
7	6	4,5	2	1	4,5	3	21
8	5	3	2	1	6	4	21
9	4,5	3	1	2	6	4,5	21
Somme	46,5	32,5	14,0	13,0	49,5	33,5	189,0
moyenne	5,16	3,61	1,56	1,44	5,50	3,72	3,50

⟺

TABLEAU 1*b*

Notation symbolique

Traitement / Bloc	1 ... *j* ... J	Somme
1	$R_{11} .. R_{1j} .. R_{1J}$	$J(J+1)/2$
2	$R_{21} .. R_{2j} .. R_{2J}$	$J(J+1)/2$
...	. .	
...	. .	
...	. .	
i	$R_{i1} .. R_{ij} .. R_{iJ}$	$J(J+1)/2$
...	. . .	
...	. . .	
I	$R_{I1} .. R_{Ij} .. R_{IJ}$	$J(J+1)/2$
Somme	R_{1} R_{j} R_{J}	$IJ(J+1)/2$
moyenne	$R_{.1}$ $R_{.i}$ $R_{.J}$	$(J+1)/2$

et d'en rechercher la distribution d'échantillonnage *sous l'hypothèse qu'il n'y a pas de différence entre les traitements.* On voit que les grandes valeurs de S permettront de penser qu'il existe des différences entre les traitements. Plus précisément, l'étude de la distribution de S permettra de fixer une valeur critique qui, si elle est dépassée, entraînera le rejet de l'hypothèse d'identité des traitements.

Cette distribution est théoriquement facile à calculer; pour s'en persuader, supposons un instant que $J = 3$, $I = 4$, les douze rangs ne peuvent prendre qu'un nombre limité de valeurs. Dans un bloc donné nous ne pouvons avoir que les classements suivants :

123, 132, 213, 231, 312, 321.

soit $3! = 3 \times 2 \times 1 = 6$ valeurs, et pour l'ensemble des quatre blocs $(3!)^4 = 1\,296$ valeurs. Sous l'hypothèse d'identité on peut donc calculer toutes les valeurs possibles de S et en tracer la distribution. Dès que la taille du tableau augmente, le nombre des valeurs possibles de S croît très vite, il n'est plus possible de les calculer toutes (égal à $(J!)^I$, ce nombre est de l'ordre de $5{,}2 \times 10^{25}$). Par contre on sait calculer la moyenne et la variance de S :

$$E(S) = \frac{IJ(J^2 - 1)}{12} \qquad \text{var}(S) = \frac{J^2 I(I-1)(J-1)(J+1)^2}{72} \tag{2.2}$$

Une fonction linéaire de S comme $F_R = \dfrac{12\,S}{IJ(J+1)}$ a pour moyenne et pour variance :

$$E(F_R) = J - 1 \qquad \text{var}\,(F_R) = 2(J-1)\frac{I-1}{I} \simeq 2(J-1) \tag{2.3}$$

Les deux premiers moments de F_R sont ceux d'une distribution du χ^2, on peut démontrer que les moments d'ordre supérieur sont aussi voisins de ceux du χ^2; donc F_R a une distribution qui peut être assimilée à celle d'un χ^2 à $J - 1$ degrés de liberté. Si bien que pour tester l'identité des traitements on prend la statistique F_R, dite *statistique de Friedman* (FRIEDMAN, 1937)

$$F_R = \frac{12}{IJ(J+1)} \sum_{j=1}^{j=J} (R_j - I(J+1)/2)^2 \tag{2.4}$$

ou sous une forme équivalente encore plus simple pour effectuer les calculs :

$$F_R = \frac{12}{IJ(J+1)} \sum_j R_j^2 - 3I(J+1) \tag{2.4$'$}$$

Il suffit alors de comparer la valeur calculée de F_R à la valeur d'un χ^2 à $J - 1$ degrés de liberté au seuil de signification α choisi, on rejettera l'hypothèse qu'il n'y a pas de différence entre les traitements si

$$F_R > \chi^2_{J-1;\,\alpha} \tag{2.5}$$

Plus précisément cette approximation est valable dès que $IJ \geqslant 30$ (LEHMANN, 1975), dans le cas contraire on pourra consulter les tables fournies dans de nombreux ouvrages comme ceux de SIEGEL (1956), HOLLANDER (1973) ou LEHMANN (1975).

Exemple : si nous reprenons les données du tableau 1*a*, nous avons :

$$F_R = \frac{12}{9 \times 6 \times 7} [46{,}5^2 + 32{,}5^2 + 14^2 + 13^2 + 49{,}5^2 + 33{,}5^2] - [3 \times 9 \times 7] = 38{,}17$$

Au seuil $\alpha = 0{,}05$, la valeur critique d'un χ^2 à 5 degrés de liberté est $\chi^2_{5;\,0{,}05} = 11{,}07$; F_R étant supérieur à cette valeur, nous rejetons donc l'hypothèse d'identité des six vins.

2.1.2. *Un retour sur l'analyse de variance « classique ».*

Avant d'aller plus avant, essayons de voir simplement ce que nous avons gagné en appliquant le test de FRIEDMAN à la place du test d'analyse de variance conduisant à la statistique de FISHER-SNEDECOR. Pour pouvoir employer cette dernière nous aurions dû supposer l'égalité des variances des observations et la normalité des distributions des observations. Ici aucune hypothèse de ce type; nous devons simplement supposer que les erreurs commises proviennent de la même distribution qu'il est d'ailleurs inutile de connaître. Si nous avons des doutes sur la nature de la distribution des observations le niveau de signification du test de FISHER dépend de la nature de cette distribution alors que celui de FRIEDMAN n'en dépend pas. Naturellement si toutes les conditions ci-dessus sont réalisées, nous devrons employer le test de FISHER. Si nous ne le faisons pas nous perdons une certaine information; cette perte d'information se mesure par une sorte de rendement du test de FRIEDMAN par rapport au meilleur test (si les conditions pour l'appliquer sont réalisées bien sûr). Ce rendement, appelé efficacité asymptotique, peut se calculer :

J	2	5	10	15	∞
efficacité asymptotique	0.64	0,80	0.87	0.90	0.95

On voit donc que dès que $J \geqslant 5$, cette efficacité de 80 p. 100 est largement compensée par l'absence d'hypothèse souvent trop restrictive; théoriquement elle est égale à $\frac{3J}{\pi(J+1)}$. Dans les tests de dégustation, le problème ne se pose même pas puisque les rangs sont nos données de base, et qu'il est bien difficile d'admettre que le test de FISHER peut s'appliquer. Nous avons passé sous silence le problème de la randomisation, nous y reviendrons au paragraphe 2.4, car cet aspect est commun aux deux types d'analyse quels que soient les modèles sous-jacents.

2.1.3. *Corrections pour exaequo.*

Bien que nous ne l'ayons pas dit, nous devons supposer pour employer le test de FRIEDMAN qu'il n'y a pas d'exaequo à l'intérieur d'un bloc, s'il n'en est pas ainsi la somme des carrés des écarts doit être corrigée de la façon suivante : si dans le premier bloc il y a seulement g_1 valeurs distinctes, avec t_{11} valeurs égales au plus petit rang, t_{12} égales au suivant etc..., et la même chose dans les autres blocs, on doit remplacer F_R par F_R^* tel que :

$$F_R^* = F_R \Big/ \left[1 - \sum_{i=1}^{I} \sum_{k=1}^{gi} (t^3_{ik} - t_{ik}) / (IJ(J^2 - 1)) \right] \qquad (2.6)$$

Nous voyons que s'il n'y a pas d'exaequo dans tout bloc, $g_i = J$ (puisqu'il y a J valeurs distinctes), et toutes les valeurs t_i étant égales à 1 le terme correctif vaut 1, donc $F = F^*$.

Exemple : Toujours avec les données du tableau 1*a*, nous voyons que le dégustateur 1 n'introduira aucune correction, par contre le deuxième avec $g_2 = 5$, $t_{21} = t_{22} = t_{23} = 1$, $t_{24} = 2$, $t_{25} = 1$, introduira la correction.

$$(1^3 - 1) + (1^3 - 1) + (1^3 - 1) + (2^3 - 2) + (1^3 - 1) = 6$$

la même correction sera introduite par les dégustateurs 3, 5, 7, 9 donc le terme correctif sera :

$$1 - (6 + 6 + 6 + 6 + 6)/9 \times 6(36 - 1) = 1 - \frac{5 \times 6}{9 \times 6 \times 35} = 1 - \frac{1}{63}$$

Soit $F_R^* = 38{,}17 \times \frac{63}{62} = 38{,}79$; l'influence du facteur correctif est donc très faible, ce sera le cas lorsque les exaequo seront peu nombreux (g_i voisin de J) et quand il y aura peu de données identiques (t_{ik} peu élevés de l'ordre de 2 ou 3). Ainsi s'il n'y avait d'exaequo que dans deux blocs et si les rangs étaient tels que trois produits ne soient pas départagés le facteur correctif serait de la forme $1 - \frac{2(3^3 - 3)}{9 \times 6 \times 35}$ conduisant à un F_R^* de 39,17; la correction est dans ce cas plus forte. On conçoit donc que la précision de l'approximation de la distribution de F_R^* à un $\chi^2{}_{J-1}$ dépende de la configuration (le nombre de blocs concernés, nombre d'exaequo) des exaequo, pour plus de détail voir LEHMANN (1975).

2.2. *Analyse sur des données dichotomiques*

Quelquefois le tableau des données de dégustation peut prendre une forme particulière : les dégustateurs ne classent pas les produits mais les acceptent ou les refusent; conventionnellement l'acceptation peut être représentée par un 1, le refus par un 0 (tabl. 2*a* et 2*b*). La somme de la ligne *i*, soit B_i, représente le nombre de produits acceptés par le dégustateur *i*, et la somme de la colonne *j* soit T_j, représente le nombre de fois où le produit *j* a été accepté. COCHRAN (1950) a proposé une méthode pour analyser ce type de données qui correspondrait à une analyse de variance sur des données (0,1); nous allons voir qu'avec les résultats du paragraphe précédent nous pouvons facilement retrouver la statistique de Cochran. Il suffit d'appliquer la formule (2.6) qui permet de calculer la statistique de Friedman dans le cas d'exaequo. Avec les notations du paragraphe 2.1.3., nous avons dans chaque bloc $g_i = 2$, et si nous classons premiers exaequo les produits acceptés nous avons $t_{i1} = B_i$ et $t_{i2} = J - B_i$. Le rang moyen de ces derniers vaut alors $[1 + 2 + \dots (J - B_i)]/(J - B_i) = \frac{1}{2}(J - B_i + 1)$ puisque c'est la moyenne de la somme des $J - B_i$ premiers nombres entiers. Le rang moyen des produits acceptés est alors $J - \frac{B_i}{2} + \frac{1}{2}$.

Il suffit alors de calculer la somme des rangs R_j du produit *j*, et de

TABLEAU 2*a*

Exemple de données dichotomiques

Vin Dégustateurs	A	B	C	D	E	F	B_i
1	0	1	1	1	0	0	3
2	0	1	1	1	0	0	3
3	0	0	1	1	0	1	3
4	0	0	1	1	0	1	3
5	0	1	1	1	0	0	3
6	0	0	1	1	0	1	3
7	0	1	1	1	0	1	4
8	0	0	1	1	0	1	3
9	0	1	1	1	0	0	3
T_j	0	5	9	9	0	5	28

$\Longleftrightarrow$

TABLEAU 2*b*

Notation symbolique

Traitement Bloc	1	2	...	j	...	J	B_i
1							B_1
2							B_2
.							
.							.
i				x_{ij}			B_i
.							.
.							.
.							.
I							B_I
T_j	T_1	T_2	...	T_j	...	T_J	

calculer F_R^* par (2.6) on aboutit alors à la statistique connue sous le nom de *Q de Cochran.*

$$Q = \frac{(J - 1)[J\sum T_j^2 - (\sum T_j)^2]}{J\sum B_i - \sum B_i^2} \tag{2.7}$$

On ne connaît pas la distribution exacte de Q, mais on peut l'approcher par une distribution du χ^2 à J — 1 de liberté. C'est-à-dire si :

$$Q > \chi^2_{J-1;\alpha} \tag{2.8}$$

nous concluons qu'acceptations et rejets ne sont pas distribués au hasard, et que les probabilités d'acceptation (de rejet) ne sont pas les mêmes pour les J produits.

Exemple : avec les données du tableau 2*a*

$$\sum T_j = \sum B_i = 28$$
$$\sum T_j^2 = 25 + 81 + 81 + 25 = 212$$
$$\sum B_i^2 = 8 \times 3^2 + 1 \times 4^2 = 88$$

Donc $$Q = \frac{5[6 \times 212 - 28^2]}{(6 \times 28) - 88} = 30{,}50 > \chi^2_{5;\,0{,}05} = 11{,}07$$

Acceptations et rejets ne sont donc pas distribués au hasard, les probabilités d'acceptation des produits ne sont pas les mêmes; certains sont plus souvent acceptés que d'autres.

2.3. *Coefficient de concordance W de Kendall*

On peut se poser en des termes un peu différents le problème de l'analyse d'un tableau tel que le tableau 1*b*. Si tous les dégustateurs avaient des goûts homogènes, le meilleur produit serait classé premier par tous les dégustateurs, la somme des rangs de ce produit serait I, la somme du second serait 2I... et la somme du dernier serait JI. La moyenne de ces sommes de rangs étant I(J + 1)/2, la concordance complète des jugements conduirait à une somme des carrés des écarts constante et égale à :

$$\text{Smax} = \sum_j \left[jI - \frac{I(J+1)}{2}\right]^2 = I^2J(J^2 - 1)/12 \tag{2.9}$$

La somme réellement observée est :

$$S = \sum_j \left[R_j - \frac{I(J+1)}{2}\right]^2 \tag{2.10}$$

Le rapport de S à la valeur maximale possible appelé coefficient de concordance de Kendall vaut :

$$W = \frac{12S}{I^2J(J^2 - 1)} \tag{2.11}$$

W fournit une mesure de la concordance entre les dégustateurs; il varie entre 0 (aucune concordance, donc aucune différence entre les produits) et 1 (concordance

parfaite). Plus W est voisin de 1, plus les rangs donnés aux produits par les différents dégustateurs sont voisins.

On peut trouver des tables de la distribution de S ou de W, mais dès que $I > 7$ on peut approcher la distribution de :

$$\frac{12S}{IJ(J+1)} = I(J-1)W \qquad (2.12)$$

par un χ^2_{J-1}. On voit que la statistique fournie par (2.12) est identique à celle de FRIEDMAN donnée par (2.4).

Remarque : On peut calculer comme au paragraphe 2.1.1. la moyenne et la variance de W.

$$E(W) = \frac{1}{I} \qquad \text{var}(W) = \frac{2(I-1)}{I^3(J-1)} \qquad (2.12)$$

Ce sont exactement les deux premiers moments d'une distribution Béta dont les paramètres seraient :

$$\frac{I(J-1)-2}{2I} \quad \text{et} \quad \frac{(I-1)[I(J-1)-2]}{2I}$$

Il en est de même des moments d'ordre supérieur dès que $I(J-1)$ est assez grand. On peut donc tester la signification de W à l'aide des tables de la distribution Béta.

On peut même se servir de tables encore plus classiques puisque l'on sait que si la variable aléatoire X a une distribution Béta (de paramètre a et b), alors $Y = bX/[a(1-X)]$ a une distribution de FISHER-SNEDECOR de paramètre $f_1 = 2a$ et $f_2 = 2b$. Ici :

$$(I-1)\frac{W}{1-W} \quad \text{a pour paramètres} \quad f_1 = J - 1 - \frac{2}{I} \quad \text{et} \quad f_2 = (I-1)f_1.$$

Nous avons donc deux approximations possibles. Notons que, comme pour F_R on peut calculer une correction pour les exaequo; si nous écrivons $T = \sum(t^3 - t)$ où t est le nombre d'observations exaequo dans un bloc, la sommation se faisant sur tous les exaequo dans ce bloc, alors :

$$W^* = \frac{12S}{I^2J(J^2-1) - I\sum T} \qquad (2.13)$$

ou $\sum T$ est la somme étendue à tous les blocs. On peut vérifier que :

$$I(J-1)W^* = F_R^*$$

Exemple : en reprenant les données du tableau 1*a* :

$S = (46{,}5 - 31{,}5)^2 + (32{,}5 - 31{,}5)^2 + (14 - 1{,}5)^2 + (13 - 31{,}5)^2 + (33{,}5 - 31{,}5)^2 = 1\,202{,}5$

$\sum T = 5(2^3 - 2) = 30$ donc $W^* = 0{,}862$.

On peut vérifier que $F_R^*/(I(J-1)) = 38{,}79/45 = 0{,}862$ ce qui permet d'aboutir au même résultat. Le test par un χ^2_5 est donc identique. L'autre approximation

par un F de Fisher-Snédécor aboutit à $\frac{(9 - 1)0{,}862}{1 - 0{,}862} = 49{,}97$ qui est un F à 5 et 40 degrés de liberté dont la valeur est bien sûr significative (sans correction $W = 0{,}848$ et $F_{(5,40)} = 44{,}73$).

Remarquons, pour terminer ce paragraphe, qu'une valeur élevée de W ne traduit qu'une concordance élevée entre les dégustateurs, ou si l'on préfère, un rejet de l'hypothèse que les rangs donnés aux produits l'ont été au hasard, c'est-à-dire qu'il existe au seuil choisi des différences entre les produits. Cette valeur fournit donc un moyen d'affirmer qu'il existe un certain ordre entre les produits; rien ne permet d'affirmer que cet ordre soit correct.

2.4. *La randomisation*

Afin d'aller plus avant il nous faut revenir sur une notion fondamentale souvent mal perçue, celle de la randomisation; cette mauvaise perception tient au fait que cette notion ne fait pas appel à une « manipulation analytique » généralement simple quand on en connaît les règles mais à des concepts assez délicats. Si nous reprenons le schéma de départ des deux facteurs × bloc traitement où nous avons IJ « unités expérimentales », un ensemble de J traitements est affecté au hasard aux unités à l'intérieur des blocs chacune des J! affectations possibles est également probable. De plus, dans chaque bloc, les affectations sont indépendantes. D'un point de vue pratique qui nous intéresse ici, pour chaque dégustateur (les blocs) on tire au sort l'ordre de dégustation des produits (les traitements). Ce tirage est différent pour chaque dégustateur; à l'intérieur d'un bloc, chaque différence entre « unités expérimentales » est attribuée aux différences entre traitements. Expérimentalement ceci signifie que l'ordre de dégustation des produits doit être fixé par un tirage au sort différent pour chaque dégustateur. Notons que le test de Friedman et la mesure de concordance de Kendall correspondent à des situations expérimentales différentes bien qu'elles aboutissent à une expression statistique identique; les observations de chaque dégustateur étant indépendantes, l'ensemble des valeurs d'un produit j le sont aussi et l'analyse de variance de Friedman permet de voir si les différents effets dus aux traitements sont les mêmes. Dans le second cas, on considère que chaque produit est observé dans I conditions différentes; sous l'hypothèse nulle que les I conditions sont indépendantes (ces conditions se traduisent analytiquement par l'utilisation des variables aléatoires) la somme des I observations sur chaque produit j est la même; le test de l'indépendance des I conditions implique la comparaison des J totaux.

Dans le cas du rejet de l'hypothèse d'identité des traitements, on peut avoir intérêt à définir une mesure de la dépendance; c'est tout l'intérêt du coefficient de concordance de Kendall.

2.5. *Autres tableaux, autres « dispositifs »*

Bien que cette note ne se veuille pas exhaustive il est sans doute bon que le lecteur sache qu'il existe d'autres possibilités d'analyse dans le cadre des analyses du type « bloc × traitement ». Disons qu'il est bien connu qu'un dégustateur ne peut pas goûter et comparer un très grand nombre de produits (six ou sept parais-

sent être un nombre maximum): que fait-on si nous avons un nombre plus grand que ce maximum « physiologique » (par exemple une douzaine)? L'idée naturelle revient à ne faire comparer aux I dégustateurs qu'un nombre plus limité des produits; pour arriver à faire une analyse à la fois simple et qui ait une certaine « optimalité statistique » il est nécessaire d'avoir une symétrie dans les dégustations, analogue à celle que l'on trouve dans les plans d'expérience classiques en bloc incomplets équilibrés, plus précisément :

a) chaque dégustateur goûtera et rangera un même nombre $r(< \mathrm{J})$ de produits;

b) chaque produit sera goûté et rangé par un même nombre de dégustateurs, soit k ce nombre de fois ($k < \mathrm{I}$).

c) chaque couple de produits sera présenté à λ dégustateurs ($\lambda \geqslant 1$), et λ est constant pour tout couple. Avec ces conditions restrictives on peut définir un coefficient de concordance analogue au W de Kendall défini en 2.3; un test de signification basé sur W peut se calculer de la même façon (DURBIN, 1951; GIBBONS, 1971). Avec des hypothèses un peu plus restrictives on peut aussi traiter n'importe quel type de tableau à deux entrées blocs × traitements mais cette analyse déborde le cadre d'un simple article d'initiation (DOWNTON, 1976).

Enfin pour clore cette présentation, disons qu'il est aussi possible d'analyser plusieurs expériences regroupées et que le lecteur intéressé pourra se reporter à quelques articles dans des revues spécialisées (HODGES et LEHMANN, 1962; LEHMANN, 1975). C'est-à-dire qu'en définitive, presque tout ce qui est possible dans le cadre du modèle linéaire classique l'est aussi en analyse non paramétrique, même si les ouvrages de base n'y font jamais référence.

III. — Comparaisons des produits

3.1. *Nécessité d'une comparaison plus fine*

Si grâce aux tests statistiques précédents on a pu répondre à la question : « *les produits soumis à un jury de dégustation sont-ils différents ou non*? » et si la réponse est « *les produits sont statistiquement différents* », l'expérimentateur désire alors plus de précision : il veut savoir quels sont les meilleurs produits (ceux généralement placés « en tête »), quels sont les plus mauvais (ceux généralement placés « en queue »).

Il demande au statisticien un outil complémentaire : il existe un certain nombre de méthodes statistiques qui répondent à ce besoin. On les trouve dans les ouvrages consacrés à l'étude des comparaisons multiples (MILLER, 1966). La difficulté essentielle réside dans le fait que toutes ces comparaisons que l'on peut faire ne sont pas indépendantes : si le produit A est comparé à B et A à C, il est intuitif qu'il existe une certaine connaissance *a priori* pour comparer B à C et qu'il va falloir en tenir compte dans les procédures statistiques. Nous allons voir successivement trois tests qui permettent de répondre à des questions de plus en plus fines.

3.2. *Test de Kramer*

3.2.1. *Classement rapide: préférence et rejet.*

Il est quelquefois intéressant de classer très rapidement les produits. L'idée du test de Kramer (KRAMER, 1956, 1960; KAHAN *et al.*, 1973; KRAMER *et al.*, 1974) consiste à calculer la probabilité pour que sous l'hypothèse d'équiprobabilité des rangements une somme de rangs R_j soit supérieure ou inférieure à une valeur donnée. A un seuil α fixé on peut fournir des limites aux sommes des rangs R_m — R_M. L'utilisation des tables est simple; à un seuil fixé (ici $\alpha = 5$ p. cent) on consulte l'une ou l'autre des tables :

Table a : Elle est équivalente à un test de Friedman. Pour $I = 9$, $J = 6$ on voit que les valeurs sont 19-44 on conclut donc à l'existence de différences significatives entre les produits puisqu'il existe des valeurs R_j extérieures à cet intervalle.

Table b : Une fois l'hypothèse d'égalité rejetée on consulte cette table où l'on voit que la plage des valeurs est plus étroite 23-40. Si un produit a une somme inférieure à 23, on peut considérer que cette somme est significativement faible, le produit est *préféré*. De même les produits dont la somme est supérieure à 40 sont *rejetés*.

Exemple : Avec les données du tableau 1*a*, nous voyons qu'il existe des valeurs extérieures à l'intervalle 19-44; nous utilisons ce résultat comme celui du test de Friedman du paragraphe 2.1.1, et concluons à l'existence de différences. La consultation de la deuxième table conduit :

- à préférer D (13) et C (14)
- à rejeter A (46,5) et E (49,5).

Remarque : Une approche légèrement différente est celle de THOMPSON et WILLKE (1963); comme R_j ne peut prendre que des valeurs entre I et IJ (ici 9 et 54), on peut déterminer des valeurs M telles que R_j soit compris entre $I + M$ et $IJ - M$ avec une probabilité $1 - \alpha$. A cause du caractère discret de la distribution, il faut noter que α ne peut prendre qu'un nombre fini de valeurs et qu'il n'est donc pas toujours possible d'obtenir un seuil exact par exemple 5 p. 100; l'utilisateur pourra donc choisir un seuil par défaut : il sera « conservatif » dans la terminologie statistique.

3.2.2. *Utilisation directe des tables de Kramer.*

Nous voyons que les intervalles fournis par la table *a* sont plus larges que ceux de la table *b*; cette différence est due à la nature même des comparaisons multiples que nous évoquerons au prochain paragraphe. Disons que les tables *a* assurent une protection pour appliquer les valeurs des tables *b* si aucun test global, comme celui de Friedman, n'a été fait au préalable. Il existe un cas où l'on peut utiliser directement les tables *b*, celui où l'on désire comparer un produit à J — 1 produits qui ne diffèrent pas entre eux; ce peut être le cas de la comparaison d'un produit nouveau par rapport à d'autres produits connus et considérés comme identiques.

3.3. *Comparaisons multiples*

Quand l'expérimentateur sait qu'il existe des différences entre les produits à l'aide du test de Friedman, il examine les totaux individuels; il est naturellement tenté de les comparer. Le problème est assez délicat comme nous l'avons noté plus haut. Quand peut-on dire que deux totaux R_j et $R_{j'}$ sont significativement différents? En fait pour dire que deux totaux sont différents il faut faire intervenir deux éléments :

a) La précision de chaque total, c'est-à-dire le nombre de dégustateurs.

b) Le nombre total de produits comparés J. En fait dans les tests les plus élaborés on fait aussi intervenir le nombre de totaux intermédiaires entre R_j et $R_{j'}$ partant de l'idée naturelle que si nous avons le classement $R_j > R_{j'} > R_{j''}$ on doit s'attendre à ce qu'une différence pour être significative doit être plus grande entre R_j et $R_{j''}$ qu'entre R_j et $R_{j'}$ ou $R_{j'}$ et $R_{j''}$, et, *a fortiori*, encore plus importante entre le plus grand et le petit total.

Les lecteurs intéressés pourront consulter Mc DONALD et THOMPSON (1967) ou HOLLANDER et WOLFE (1973); pour notre propos nous allons nous limiter à une approximation valable dès que I, le nombre de dégustateurs, est assez grand, approximation voisine du test de Newman-Keuls (NEWMAN, 1939; KEULS, 1952). Nous dirons que deux produits *j* et *j'* sont différents au seuil α si :

$$|R_j - R_{j'}| \geqslant q(\alpha, J)\left[\frac{IJ(J+1)}{12}\right]^{1/2} \qquad (3.1)$$

$q(\alpha, J)$ sont des valeurs extraites des tables de « range-studentisé » (tabl. 3).

TABLEAU 3

Valeur $q(\alpha, J)$ « range studentisé »

J	2	3	4	5	6	7	8	9	10
α = 0,01.	3,64	4,12	4,40	4,60	4,76	4,88	4,99	5,08	5,16
α = 0,05.	2,77	3,31	3,63	3,86	4,03	4,17	4,29	4,39	4,47

Exemple : pour $\alpha = 5$ p. cent, I = 9, J = 6 une différence sera significative si elle est supérieure à $4{,}03 \times \left(\frac{9 \times 6 \times 7}{12}\right)^{1/2} = 22{,}62$.

Il suffit alors de tracer le tableau suivant (tabl. 4) après avoir ordonné les totaux par ordre croissant; on voit qu'il n'est pas utile de calculer toutes les différences puisqu'à partir du moment où le total de D est significativement différent de celui de A, il l'est aussi de celui de E; si le total de B n'est pas significativement différent de E, ceux de F et de A ne le sont pas. Nous pouvons donc conclure que :

- les produits D et C sont significativement différents de A et E;
- les produits D, C, B, F ne sont pas significativement différents;
- les produits B, F, A, E ne sont pas significativement différents.

TABLEAU 4

Comparaison des totaux

Produit $R_{j'}$ \ Produit R_j	D (13)	C (14)	B (32,5)	F (33,5)	A (46,5)
C(14)	1	0			
B(32,5)	19,5	18,5	0		
F(33,5)	20,5	19,5	1	0	
A(46,5)	[33,5]	[32,5]	14	—	0
E(49,5)	(*)	(*)	17	—	—

(*) Différence inutile à calculer : obligatoirement significative.
— Différence inutile à calculer : obligatoirement non significative.

L'ensemble de ces résultats peut être résumé dans le schéma suivant, où deux produits non reliés par des traits sont significativement différents.

D C B F A E.

Remarque : Des tests analogues peuvent être utilisés dans le cas où un produit joue le rôle de *témoin*, et où l'objectif de l'analyse réside dans la comparaison des autres produits à ce témoin et non dans la comparaison des produits autres que le témoin entre eux (HOLLANDER et WOLFE, 1973).

3.4. *Test d'un ordre prédéterminé* (PAGE, 1967)

L'hypothèse statistique que nous avons testée consistait à se demander si la configuration des totaux (les valeurs des J quantités R_j, $j = 1, \ldots J$) était compatible avec notre idée *a priori* que tous les rangs donnés par les dégustateurs étaient équiprobables. C'était notre hypothèse de travail généralement notée H_0. L'hypothèse alternative implicitement opposée à H_0 était qu'au moins un des produits était jugé différemment; l'alternative était peu précise. Si nous arrivons à la préciser davantage, nous pourrons avoir un test beaucoup plus puissant; c'est ce que permet le test de Page (PAGE, 1963). Imaginons que nous ayons une idée a *priori* de l'ordre que les dégustateurs devraient trouver; une expérience précédente aurait pu nous le suggérer, ou bien les J produits sont fabriqués dans des conditions telles qu'un ordre a un sens physique; il pourrait s'agir d'une température de fabrication et nous voudrions tester que la qualité du produit diminue ou augmente avec la température de fabrication.

L'alternative pourrait prendre alors la forme suivante :

$$H_1 : D \leqslant E \leqslant F \leqslant C \leqslant B \leqslant A \qquad (3.2)$$

où au moins une des inégalités est stricte. La statistique de Page consiste à pondérer le premier total par 1, le second par 2, ... le dernier par J et à faire la somme de toutes ces quantités :

$$L = 1 \times R_D + 2 \times R_E + 3 \times R_F + 4 \times R_c + 5 \times R_B + 6 \times R_A \qquad (3.3)$$

Si H_1 est vraie, L aura de grandes valeurs et nous rejetterons H_0; au contraire, si L a une valeur faible nous accepterons H_0 pour rejeter H_1. En pratique on peut admettre que L a une distribution normale de moyenne m et d'écart-type s donnés par :

$$\begin{cases} m = IJ(J+1)^2/4 \\ s = \dfrac{J(J+1)}{12}\sqrt{I} \end{cases} \tag{3.4}$$

Si bien que la variable

$$L^* = \frac{L - m}{s} \simeq \mathcal{N}(0,1) \tag{3.5}$$

c'est-à-dire une variable normale centrée réduite. Si bien qu'il suffit de consulter une table de la distribution normale standardisée; si z_α est la valeur correspondant à la probabilité α choisie,

On rejette H_0 si $L^* \geqslant z_{(\alpha)}$

On accepte H_0 si $L^* < z_{(\alpha)}$

Exemple : Avec les totaux du tableau 1*a*, nous avons

$L = 1 \times 13{,}0 + 2 \times 49{,}5 + 3 \times 33{,}5 + 4 \times 14{,}0 + 5 \times 32{,}5 + 6 \times 46{,}5 = 710$

$m = 9 \times 6 \times 7^2/4 = 661{,}50$; $s = 6 \times 7 \times \sqrt{9}/12 = 10{,}5$;

$L^* = (710 - 661{,}5)/10{,}5 = 4{,}62$.

Comme $z_{(0,05)} = 1{,}96$, nous rejetons H_0 et nous acceptons H_1. Pour de petits échantillons on consultera les tables de Page dans HOLLANDER et WOLFE (1973).

Remarque : On peut aussi utiliser l'approximation suivante qui nous sera utile au paragraphe 4; la quantité

$$S_L = \frac{[12L - 3IJ(J+1)^2]^2}{IJ^2(J^2-1)(J+1)} \tag{3.6}$$

est distribuée comme un χ^2 à 1 de liberté. Ici $S_L = 4{,}267$, valeur qui conduit au même résultat.

IV. — Corrélation de rang et synthèse des statistiques précédentes

4.1. *Coefficient de corrélation de rang de Spearman*

Quand on dispose de deux séries d'observations (X_1, Y_1), (X_2, Y_2), ... (X_n, Y_n) extraites d'une population à deux variables aléatoires dont le coefficient de corrélation est ρ, on sait estimer le coefficient de corrélation des deux séries par

$$r = \frac{\sum(X_i - \overline{X})(Y_i - \overline{Y})}{\sqrt{(X_i - \overline{X})^2(Y_i - \overline{Y})^2}} \tag{4.1}$$

la distribution d'échantillonnage dépend de la nature de la distribution sous-jacente; ainsi, lorsque la population a une distribution bivariate gaussienne on

sait répondre à la question « le coefficient de corrélation des deux populations est-il nul »? Mais si la distribution n'est plus gaussienne le test classique n'est plus valable; dans la logique de ce que nous avons vu il est naturel de remplacer X_i par son rang dans la série des x, soit $R_i = r(X_i)$, et de remplacer Y_i par son rang dans la série des y soit $S_i = r(Y_i)$; on doit étudier alors les deux séries (R_1, S_1), (R_2, S_2) ... (R_n, S_n), si nous posons :

$$D_i = R_i - S_i \qquad (4.2)$$

C'est-à-dire que D_i représente la différence des rangs des deux séries.

On peut calculer entre les deux séries *le coefficient de corrélation de rang de Spearman* :

$$r_s = \frac{\sum(R_i - \bar{R})(S_i - \bar{S})}{\sqrt{\sum(R_i - \bar{R})^2 \sum(S_i - \bar{S})^2}} = 1 - \frac{6\sum D_i^2}{n(n^2 - 1)} \qquad (4.3)$$

coefficient qui peut varier entre -1 (discordance parfaite) et $+1$ (concordance parfaite).

Exemple: Reprenons les classements des dégustateurs 1 et 8 du tableau 1*a* (tabl. 5) avec $n = 6$, $\sum D_i^2 = 6$ on trouve

$$r_s = 1 - 6 \times \frac{6(6^2 - 1)}{6} = 0{,}829$$

On sait calculer les valeurs exactes de la distribution de r_s, sous l'hypothèse d'indépendance des deux séries, par énumération; ce calcul est long et fastidieux. Il existe des tables lorsque $n \leqslant 10$ (SNEDECOR, 1971), mais $r_s\sqrt{n-1}$ est une variable gaussienne de moyenne 0 et d'écart type 1 dès que $n > 10$.

Ici pour $n = 6$, les valeurs exactes sont respectivement 0,829 (à 5 p. cent) et 0,943 (à 1 p. cent), donc le coefficient de corrélation est à la limite du seuil de signification à 5 p. 100. Pour notre propos actuel nous ne nous étendrons pas sur cet aspect, nous retiendrons simplement que le calcul du coefficient de SPEARMAN s'effectue comme celui du coefficient habituel en remplaçant simplement les valeurs X_i et Y_i par leur rang respectif.

Cet aspect numérique est particulièrement intéressant puisqu'un programme de calcul pour ordinateur permet de calculer aussi bien l'une que l'autre après transformation des valeurs numériques en leur rang.

Remarque: Le coefficient de corrélation de rang de Spearman n'est pas l'unique statistique non paramétrique permettant à la fois de tester l'indépendance de deux séries et de fournir une mesure de cette dépendance; parmi les plus connues on peut citer le coefficient tau de Kendall, celui de Van der Waerden (HAJEK, 1969). Pour notre propos, le coefficient de Spearman a l'avantage incontestable de proposer une vue unitaire pour de nombreuses autres statistiques.

4.2. *Coefficient de Spearman et coefficient de concordance*

Au paragraphe 2.3 nous avons introduit ce coefficient de concordance W comme une mesure du rapport des écarts des I classements au classement identique pour les I dégustateurs. On pourrait faire une approche différente; imaginons que nous calculions tous ces coefficients de corrélation de Spearman entre toutes les paires

TABLEAU 5

Éléments du calcul du coefficient de corrélation de rang de Spearman entre les dégustateurs 1 et 8

L	1	2	3	4	5	6	
Dégustateur 1 : R_i	6	3	2	1	4	5	
Dégustateur 8 : S_i	5	3	2	1	6	4	
$D_i = R_i - S_i$	1	0	0	0	—2	1	
D_i^2	1	0	0	0	4	1	$\sum D_i^2 = 6$

TABLEAU 6

Tableau d'analyse de variance du tableau 1b

Origine de la variation	Degrés de liberté	Somme des carrés
Entre traitements	$J - 1$	S/I
Entre blocs (*).	$I - 1$	0
Résiduelle	$(I - 1)(J - 1)$	$S_R = S_T - S/I$
Total	$IJ - 1$	S_T

(*) La somme des carrés entre blocs est nulle puisque les sommes des I blocs sont constantes.

de dégustateurs (ce que nous avons fait pour la seule paire 1 et 8, au paragraphe précédent). Avec les I dégustateurs il y a I(I — 1) /2 telles paires (dans notre exemple avec I = 9, il y en a 9(9 — 1) /2 = 36). Une mesure de la concordance peut être fournie par la moyenne de tous ces coefficients que nous notons $\bar{r}_s$. On peut montrer qu'il existe une relation entre $\bar{r}_s$ et W, cette relation est

$$W = \frac{1 + (I - 1)\bar{r}_s}{I}, \qquad \text{ou} \qquad (4.4)$$

$$\bar{r}_s = \frac{IW - 1}{I - 1} \qquad (4.4)'$$

La différence entre $\bar{r}_s$ et W réside dans ce que $\bar{r}_s$ peut varier entre — 1 et + 1 et W entre 0 et 1. W ne peut être négatif, puisque si nous avons plus de deux classements les rangs ne peuvent pas être en discordance complète. Ainsi lorsque deux dégustateurs 1 et 2 ont des rangements opposés, si 1 est aussi opposé au juge 3, les juges 2 et 3 ne peuvent pas être en discordance complète : I dégustateurs peuvent avoir des jugements parfaitement concordants, mais ils ne peuvent pas avoir des jugements entièrement discordants, si W = 0, $\bar{r}_s = \frac{-1}{I - 1}$.

Exemple : en 2.3, nous avions trouvé W* = 0,862, la moyenne des coefficients de corrélation $\bar{r}_s = \frac{9 \times 0{,}862 - 1}{9 - 1} = 0{,}845$.

4.3 *Coefficient de Spearman et statistique de Page*

Au paragraphe 3.4 nous avons opposé à l'hypothèse H_0 (identité des J traitements) une hypothèse H_1 (il existe un ordre déterminé des produits connu *a priori*).

Cette dernière peut se formuler d'une façon différente; l'ordre supposé pour les six produits était 6 5 4 1 2 3. De même qu'au paragraphe précédent nous avons calculé une concordance globale, nous pouvons ici calculer une concordance par rapport à l'ordre présumé. Il suffirait de calculer pour chaque dégustateur le coefficient de corrélation de rang entre l'ordre présumé et l'ordre effectivement trouvé. Il existe I coefficients r_i, si nous en calculons la moyenne $\bar{r} = \frac{1}{I}\sum r_i$, on peut montrer que cette valeur moyenne est liée à la statistique L de Page par la relation :

$$r = \frac{12L}{IJ(J^2 - 1)} - 3\frac{J + 1}{J - 1} \qquad (4.5)$$

Exemple : Nous avons trouvé L = 710, J = 6, I = 9 donc

$$\bar{r} = \frac{12 \times 710}{9 \times 6 \times 35} - 3 \times \frac{7}{5} = 0{,}308$$

On voit d'après ces deux exemples tout l'intérêt de la statistique de Spearman qui permet de donner un sens profond à deux statistiques, le W de Kendall et le L de Page, et par là même d'en comprendre la formulation.

4.4. *Tableau d'analyse de variance*

Afin de clore ce tour d'horizon sur les problèmes univariates nous allons redonner la forme classique d'une analyse de variance qui se traduit par le tableau précédent (tabl. 6). On peut montrer que la somme des carrés totale est constante et égale à :

$$S_T = IJ \frac{J^2 - 1}{12} \tag{4.6}$$

La somme des carrés traitements est liée à la statistique de Friedman par

$$\frac{S}{I} = \frac{J(J+1)}{12} F_R$$

On voit dans ces conditions que :

$$\frac{S/I}{S_T} = \frac{12S}{I^2J(J^2-1)} = W$$

C'est-à-dire que W a un statut de « *coefficient de corrélation multiple* » (appelé parfois coefficient de détermination).

De même, comme

$$\frac{S/I}{S_T} = 1 - \frac{S_R}{S_T} = W$$

le rapport $\frac{S/I}{S_R} = \frac{S/I/S_T}{S_R/S_T} = \frac{W}{1-W}$ est le rapport des sommes des carrés traitement/résiduelle. Le test F en analyse de variance consiste à diviser chaque terme par son nombre de degrés de liberté $J - 1$ pour le numérateur, $(I-1)(J-1)$ pour le dénominateur donc $(I-1)\frac{W}{1-W}$ est la statistique de Fisher-Snédécor, approximation que nous avions trouvée au paragraphe 2.3.

TABLEAU 7

Tableau d'analyse de variance correspondant aux données du tableau Ia

Origine de la variation	Degrés de liberté	Somme des carrés	Carré Moyen
Entre traitements	5	133,61	26,722
contraste (6, 5, 4, 1, 2, 3)	1	14,94	
complément	4	118,67	
Entre blocs	8	0	
Résiduelle	40	23,89	0,597
Total	53	157,50	

Exemple : $\frac{S}{I} = \frac{6 \times 7}{12} \times 38,77 = 133,61.$

De même on peut exprimer la statistique L de Page, en fonction de sa contribution à la somme des carrés traitement $\frac{J(J+1)}{12} S_L$, qui vaut ici : $\frac{6 \times 7}{12} \times 4,267 = 14,94$. La statistique de Page apparaît alors comme le test d'une combinaison linéaire particulière. Nous pouvons donc résumer l'analyse de variance du tableau 1*a* par le tableau 7.

V. — Essais d'analyse multivariate

5.1. *Analyse en composantes principales : principe*

Que l'on analyse les données du tableau 1 en faisant une analyse de Friedman (suivie ou non d'une comparaison multiple des produits), ou que l'on étudie la concordance de plusieurs jugements, on résume l'information du tableau en une statistique globale. Ce résumé, pour intéressant qu'il soit, détruit une partie de l'information du tableau ou au moins en masque certains aspects. En particulier, sauf dans le cas extrême où tous les produits sont classés de la même façon par tous les dégustateurs, on perd des informations du type :

- tel produit est jugé le meilleur par un groupe de dégustateurs,
- tel dégustateur a un classement différent des autres; il préfère un produit particulier.

Il est possible de répondre à toutes ces questions en faisant sur les données du tableau 1 une analyse en composantes principales (que nous noterons désormais ACP) en faisant jouer aux produits le rôle des observations et aux dégustateurs celui des variables. Si nous appelons x_1, x_2, ... x_I (ici $x_I = x_9$) les variables, c'est-à-dire les rangs donnés par les dégustateurs aux J produits, l'ACP revient à chercher des combinaisons linéaires :

$$y_1 = a_{11}x_1 + a_{12}x_2 + \dots a_{1I}x_I \qquad (5.1)$$
$$y_2 = a_{21}x_1 + a_{22}x_2 + \dots a_{2I}x_I \text{ etc...}$$

telles que y_1 ait la plus grande variance, que y_2, non corrélée avec y_1, ait la plus grande variance sous cette condition, etc...

Connaissant les coefficients a_{11}, a_{12}, ..., il est alors possible pour un produit dont on connaît les rangs qui lui ont été donnés par les dégustateurs de calculer y_1, y_2 etc... Nous voyons, que si pour un y_j donné tous les coefficients a sont égaux (par exemple à $1/\sqrt{I}$ pour que la somme des carrés $a^2_{j1} + a^2_{j2} + \dots a^2_{jI}$ soit égale à 1), y_j sera proportionnel à la somme des rangs qui lui ont été donnés. Si c'est y_1, on pourra affirmer que ce sont les sommes des rangs qui ont le meilleur pouvoir discriminateur entre les produits. Mais pour y_2 certains coefficients seront obligatoirement positifs, d'autres négatifs (cette « obligation » tient au fait que y_1 et y_2 sont non corrélés). On pourra alors tenter une interprétation en fonction des différences de goût. Bien sûr, si c'est la première composante, celle qui traduit la plus grande variabilité, qui contient cette alternance de signe on dira que ce sont

les discordances de goût et non les concordances qui sont le facteur le plus important. De forts coefficients a_{ji}, pour une composante j fixée, signifieront que le poids du dégustateur i est grand dans cette composante, ce qui donne un moyen d'interpréter les composantes; un coefficient a_{ji} est proportionnel au coefficient de corrélation entre la composante et le dégustateur i.

Le calcul pour le produit A de y_1 (A), y_2 (A), ... pour B de y_1 (B), y_2 (B), ... etc... pour tous les produits, permet de tracer un graphique plan y_1, y_2 où les positions relatives proches des produits indiqueront leur ressemblance. Ceci, lié au fait que l'on sait interpréter les composantes en fonction des dégustateurs, fournit un moyen graphique simple d'analyser les données du tableau 1. Naturellement, il faudra savoir si cette représentation plane est « fidèle ». Nous verrons au paragraphe suivant sur un exemple que les variances de y_1, de y_2 etc... dont la somme est constante permettent de juger de cette adéquation. Si elle n'était pas suffisante on pourrait ajouter une et même plusieurs composantes supplémentaires.

On comprendra mieux sur un exemple pourquoi cette analyse permet d'avoir une vision plus fine du tableau dans la mesure où le calcul des nouvelles composantes y passe par une analyse de l'ensemble des coefficients de corrélation de SPEARMAN entre tous les classements de toutes les paires de dégustateurs. On sait qu'il y a I (I — 1) /2 telles paires.

TABLEAU 8

Résultats de l'analyse en composantes principales sur les données d'intensité colorante

a

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	1 000								
2	580	1 000							
3	725	956	1 000						
4	829	841	870	1 000					
5	812	809	897	812	1 000				
6	657	986	986	886	841	1 000			
7	812	809	809	986	735	841	1 000		
8	829	841	928	886	986	886	812	1 000	
9	754	868	956	754	941	899	676	928	1 000

b

	y_1	y_2
	$\lambda_1 = 7{,}773$	$\lambda_2 = 0{,}603$
	86,37 %	6,70 %
1	0,2986	— 0,6136
2	0,3309	0,3848
3	0,3494	0,2557
4	0,3368	— 0,3048
5	0,3363	0,0351
6	0,3433	0,2872
7	0,3201	— 0,3946
8	0,3474	— 0,0224
9	0,3342	0,2780

c

	y_1	y_2
A	2,664	— 0,963
B	0,180	0,075
C	— 3,156	— 0,582
D	— 3,304	0,767
E	3,278	1,024
F	0,338	— 0,321

a) Coefficients de Spearman × 1 000 entre dégustateurs.
b) Coefficients des dégustateurs sur les composantes a_{ij} : $i = 1, 2$; $j = 1, \ldots 9$.
c) Scores des produits sur les deux composantes.

5.2. *Un exemple. Analyse de l'intensité colorante*

Voyons ce que donne l'analyse des données du tableau 1*a*. Nous pouvons vérifier (tabl. 8) que la moyenne des coefficients de corrélation égale à 30,424/36 = 0,845, c'est-à-dire la valeur trouvée en 4.2 à partir de la valeur du coefficient de concordance W* de Kendall.

5.2.1. *Première composante.*

Au tableau 8*b*, nous voyons que la première composante exprime à elle seule 86.37 p. 100 de la variabilité; ses coefficients tous positifs sont presque tous égaux (le plus faible est 0,2986 le plus fort 0,3494), ceci tient au fait qu'il n'y a pas de

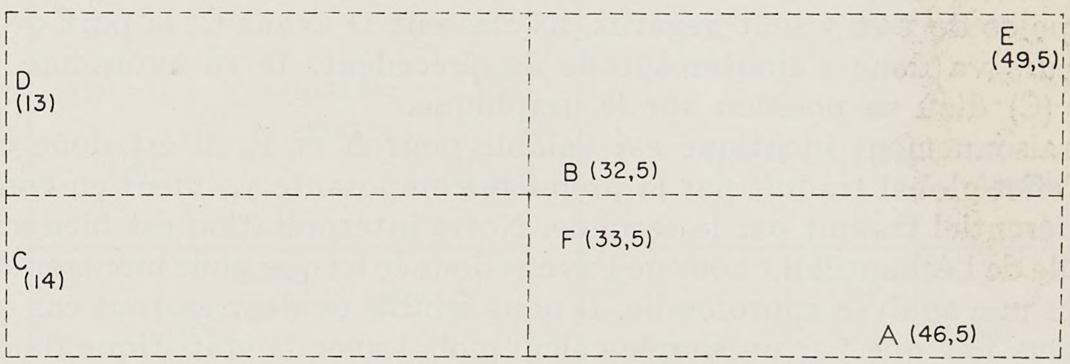


FIG. 1. — *Analyse en composantes principales (critère 1) : premier plan factoriel (entre parenthèses somme des rangs de chaque vin)*

classement inversé, et que tous les coefficients de corrélation sont assez voisins. Les valeurs pour les six produits vont de — 3,304 pour D à + 3,278 pour E; ces valeurs respectent l'ordre des sommes des rangs puisque tous les coefficients sont sensiblement identiques. Le fait que l'on ait des valeurs négatives et positives provient de ce que l'on a centré les dégustateurs variables (on a calculé leur écart à la moyenne; cette moyenne est égale à 3,5 pour tous les dégustateurs : cf. tabl. 1*a*). En outre on a divisé chaque valeur centrée par l'écart-type du dégustateur (cet écart-type est aussi constant pour chaque dégustateur : s'il n'a pas de donnée de rangs exaequo, il vaut 1,71; avec deux exaequo il est légèrement plus élevé, 1,84). Ce centrage et cette réduction n'ont aucune influence ici sur l'interprétation.

5.2.2. *Deuxième composante.*

Nous voyons ici apparaître des alternances de signe — 0,6136 pour le premier dégustateur, 0,3848 pour le second, etc... En fait à cette alternance de signe, s'ajoute le fait que certains coefficients sont élevés (le rang du dégustateur correspondant sera affecté d'un grand poids) et d'autres sont faibles (le rang du dégustateur correspondant sera sans grande importance pour le calcul). Il est clair que les dégustateurs 1 et 7 ont des poids négatifs importants, 2 a un poids positif. Puisque sur le graphique l'axe 2 vertical sépare A de E, et C de D, reprenons dans le tableau 9 l'extrait des classements de ces quatre vins par les trois dégustateurs. Il est bien net que les vins A et E globalement mauvais, les vins C et D globalement bons sont jugés différemment par le dégustateur 2 et par les dégustateurs 1 et 7.

TABLEAU 9

Classement des vins A, C, D, E
par les dégustateurs 1, 2 et 7 (extrait du tab. 1*a*)

Vin		A	C	D	E
Dégustateurs	Coefficient				
1	— 0,6136	6	2	1	4
7	— 0,3946	6	2	1	4,5
2	0,3848	4,5	1	2	6

Le poids de 2 est positif ,il classe C avant D; dans y_2 la part de ce dégustateur donnera une valeur plus grande à D qu'à C.

Les poids de 1 et 7 sont négatifs, ils classent D avant C; la part de ces deux dégustateurs va donc s'ajouter à celle du précédent. D va avoir une valeur y_2 (D) $>$ y_2 (C) d'où sa position sur le graphique.

Un raisonnement identique est valable pour A et E. Il est donc clair qu'à côté de l'effet global traduit par la première composante y_1, vient en complément l'effet différentiel traduit par la seconde. Notre interprétation est bien sûr limitée par la taille de l'échantillon; nous ne l'avons donnée ici que pour montrer la manière d'effectuer une analyse approfondie. Il nous semble évident en tout cas que l'analyse est plus fine que par un simple calcul global avec la statistique de Friedman ou celle de Kendall.

5.2.3. *Remarques :* a) *Test de signification des valeurs propres.*

La loi de distribution des r_s ne dépend que de la taille de l'échantillon J sous l'hypothèse d'indépendance. La loi des valeurs propres ne dépend que de I et de J. On peut donc déterminer par simulation des seuils de signification; par conséquent, on sait combien de composantes il est possible de conserver dans l'interprétation. Ceci n'a d'intérêt que pour des échantillons assez importants, J au moins supérieur à 20; nous renvoyons le lecteur intéressé à Lebart et Fenelon (1975).

b) *Si tous les coefficients de corrélation sont égaux à r,* la première valeur propre exprimée en p. 100 vaut exactement :

$$\lambda_1 \text{ (p. cent)} = [1 + (I - 1)r]/I \qquad (5.2)$$

Dans ce cas $\bar{r}_s = r$, et on reconnaît l'expression du coefficient de concordance W de Kendall; donc W $\leqslant$ λ_1 (p. cent) (l'égalité n'ayant lieu que si tous les coefficients sont égaux) et la comparaison de W à λ_1 permet de juger de la variabilité des jugements.

5.3. *Analyses séparées des autres critères*

L'analyse sur le premier critère à l'avantage de la simplicité : il y a une concordance élevée traduisant le fait qu'aucun des dégustateurs ne donne des classements opposés aboutissant à des coefficients de corrélation négatifs.

Ce n'est bien sûr pas toujours le cas. Si nous nous limitons aux seuls critères conduisant à un test de Friedman significatif nous voyons qu'il y a des inversions

de signe pour X_4, X_5, et X_{10} (tabl. 10). Si nous regardons d'un peu plus près X_5 seul le dégustateur 3 apparaît dans la première composante avec un coefficient positif, tous les autres sont négatifs. Le classement de ce dégustateur doit être différent des huit autres, en effet :

Produit	A	B	C	D	E	F
dégustateur 3.	1,5	5	3,5	3,5	6	1,5
rang moyen donné par les huit autres dégustateurs	5,3	3,9	2,1	2,7	2,8	4,4
Score de y_1.	— 2,6	0	1,9	1,3	1,9	— 2,4

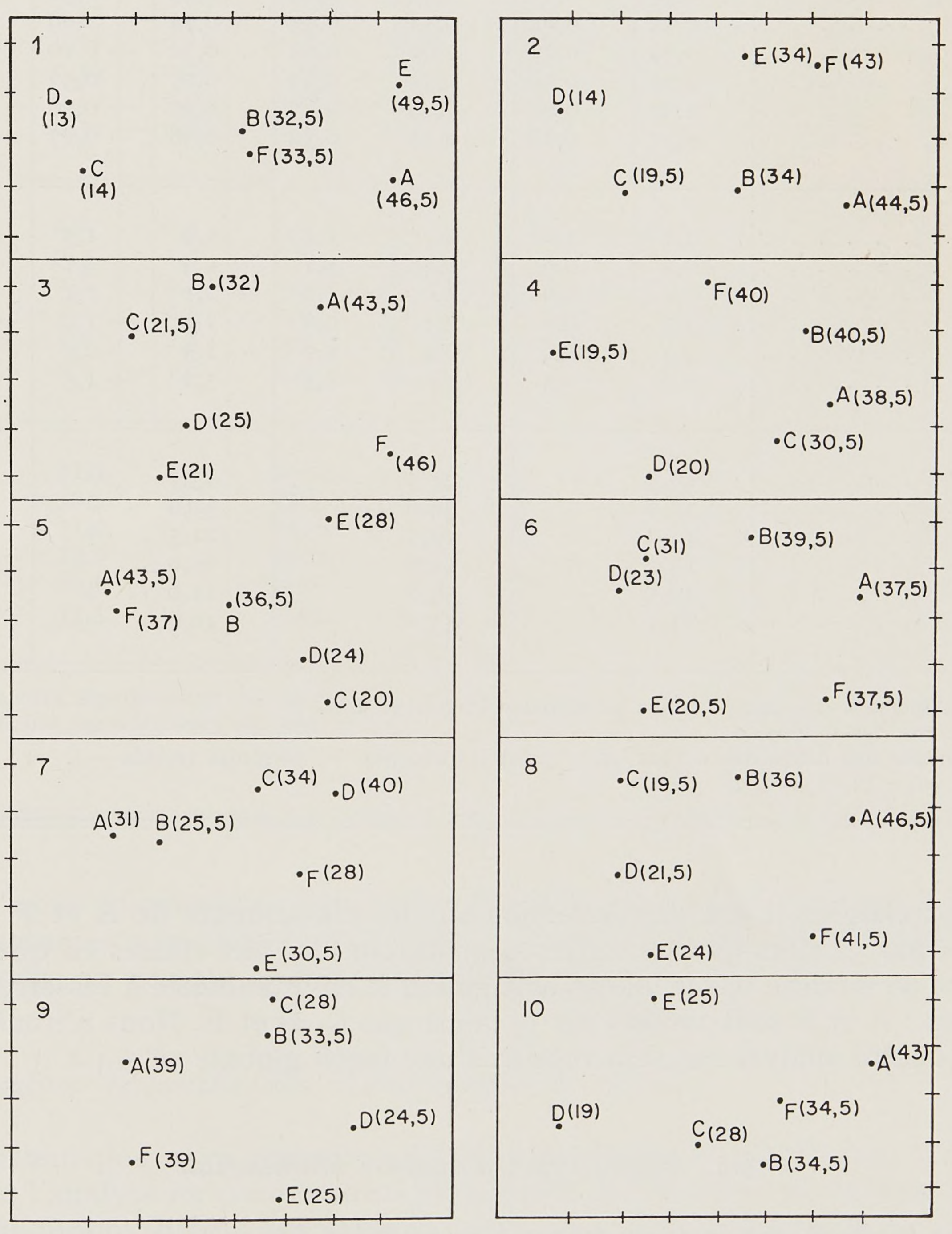


FIG. 2. — *Analyse en composantes principales : représentation schématique des 6 vins dans les dix premiers plans factoriels (analyse séparée sur chacun des 10 critères) (entre parenthèses somme des rangs de chaque vin pour chaque critère séparé).*

TABLEAU

Analyse des 10 critères définis au § 1 F_R : Test de Friedman, W = coefficient de concordance de Kendall.
λ_1 et λ_2 : Valeurs des 2 premières composantes principales de l'A.C.P.

	1		2		3		4	
F_R	38,17 (**)		24,25 (**)		19,26 (**)		15,22 (**)	
W	0,848		0,539		0,428		0,338	
λ_1 % / λ_2 %	0,864	0,067	0,598	0,228	0,485	0,338	0,510	0,231
a) 1	0,30	— 0,62	0,42	0,03	0,29	— 0,35	0,46	0,01
2	0,33	0,38	0,25	0,53	0,04	0,55	0,46	0,05
3	0,35	0,26	0,41	0,11	0,40	0,15	0,12	0,63
4	0,34	— 0,30	0,31	0,05	0,39	0,32	0,31	0,04
5	0,34	0,04	0,42	0,03	0,44	0,09	0,23	— 0,03
6	0,34	0,29	0,09	0,64	0,31	— 0,10	— 0,26	0,50
7	0,32	— 0,39	0,32	— 0,33	0,17	0,53	0,46	0,04
8	0,35	— 0,02	0,28	— 0,17	0,37	— 0,26	0,36	0,17
9	0,33	0,28	0,35	0,39	0,38	— 0,27	— 0,11	0,56
b) A	2,7	— 1,0	2,7	— 1,4	1,9	1,5	2,2	— 0,5
B	0,2	0,8	0,4	— 1,2	— 0,3	2,1	1,8	1,0
C	— 3,2	— 0,6	— 2,0	— 1,2	— 2,1	1,1	1,1	— 1,3
D	— 3,3	0,8	— 3,4	0,6	— 1,1	— 1,2	— 1,5	— 1,9
E	3,3	1,0	0,4	1,7	— 1,5	— 2,1	— 3,4	0,5
F	0,3	— 0,3	2,0	1,5	3,2	— 1,3	— 0,3	2,2
c) A	46,5	—	44,5	—	43,5	—	38,5	
B	32,5		34,0		32,0		40,5	—
C	14,0	+	19,5	+	21,5	+	30,5	
D	13,0	+	14,0	+	25,0		20,0	+
E	49,5	—	34,0		21,0	+	19,5	+
F	33,5		43,0	—	46,0	—	40,0	—

	5		6		7		8		9		10	
F_R	12,69 (*)		10,46		4,06		20,49 (**)		6,98		13,21 (*)	
W	0,282		0,232		0,090		0,455		0,155		0,293	
λ_1 % / λ_2 %	0,488	0,256	0,531	0,309	0,380	0,283	0,498	0,296	0,427	0,388	0,558	0,264
a) 1	— 0,23	0,57	0,31	0,41	— 0,40	0,42	0,41	— 0,16	— 0,46	— 0,12	0,37	0,32
2	— 0,05	— 0,13	0,19	0,52	0,37	0,41	0,22	0,54	— 0,11	0,51	— 0,22	0,46
3	0,37	0,28	— 0,34	0,30	0,41	0,09	0,18	— 0,09	0,40	0,24	0,44	— 0,04
4	— 0,20	0,57	0,26	— 0,45	— 0,41	— 0,20	0,41	— 0,25	— 0,37	— 0,29	0,31	0,39
5	— 0,41	— 0,25	0,37	0,14	0,39	— 0,29	0,29	0,48	— 0,26	0,44	0,43	— 0,10
6	— 0,33	0,03	— 0,31	0,22	0,16	— 0,07	0,20	— 0,40	0,17	— 0,44	0,36	— 0,11
7	— 0,42	— 0,17	0,39	0,27	0,41	0,26	0,39	0,26	— 0,31	0,25	— 0,11	— 0,60
8	— 0,41	— 0,23	0,42	0,09	0,07	— 0,47	0,40	0,11	— 0,35	0,18	0,40	— 0,08
9	— 0,37	0,33	0,37	— 0,36	— 0,12	0,47	0,37	— 0,38	— 0,40	— 0,31	0,17	— 0,38
b) A	— 2,6	0,6	2,8	0,5	2,6	0,5	2,8	0,8	— 2,4	0,8	3,1	0,8
B	— 0,	— 0,3	0,7	1,7	— 1,8	0,4	0,6	1,7	0,6	1,5	0,8	— 1,6
C	1,9	— 1,7	— 1,8	1,3	0,5	1,3	— 2,1	1,6	0,8	2,3	— 0,5	— 1,0
D	1,3	— 0,9	— 2,1	0,5	2,3	1,2	— 2,0	— 0,4	2,4	— 0,6	— 3,3	— 0,7
E	1,9	2,7	— 1,8	— 2,5	0,3	— 3,0	— 1,3	— 2,1	0,9	— 2,7	— 1,4	2,7
F	— 2,4	— 0,3	2,2	— 1,6	1,3	— 0,4	2,0	— 1,7	— 2,4	— 1,3	1,3	— 0,2
c) A	43,5	—	37,5		31,0		46,5	—	39,0		43,0	—
B	36,5		39,5		25,5		36,0		33,5		34,5	
C	20,0	+	31,0		34,0		19,5	+	28,0		28,0	
D	24,0		23,0		40,0		24,0		24,5		19,0	+
E	28,0		20,5		30,5		24,0		25,0		25,0	
F	37,0		37,5		28,0		41,5	—	39,0		39,5	

a) Coefficients des composantes principales (dégustateurs).
b) Scores des 6 vins.
c) Somme des rangs des 6 vins avec produits accepte +, produits rejetés —).
1 % 20 — 43 et 5 % 23 — 40.

(*) Valeurs significatives au seuil 5 %.
(**) Valeurs significatives au seuil 1 %.

Il est clair qu'il y a une inversion sur les classements de A et F, jugés les meilleurs par 3, alors que les autres dégustateurs les ont classés en queue. Cette différence ne modifie pas le classement global mais a tendance à resserrer l'échelle des scores : A et F sont voisins sur y_1, ainsi que C, D et E. Nous n'irons pas plus loin dans cette analyse qui sera reprise d'une façon globale en 5.4.2.

5.4. *Autres types d'analyse multivariate*

Nous n'allons pas faire un inventaire complet des méthodes d'analyse multivariate utilisables sur des données de ce type. Nous tenons seulement à montrer comment le choix d'une méthode peut avoir une influence sur l'analyse d'un même tableau : nous comparerons l'analyse factorielle des correspondances à l'analyse des composantes principales; puis nous verrons une méthode plus satisfaisante pour prendre en compte toutes les variables étudiées.

5.4.1. *Analyse factorielle des correspondances* (A.F.C.).

Le lecteur pourra se reporter à LEBART et FENELON (1975) pour voir ce qui différencie l'analyse en composantes principales de l'analyse des correspondances. Pour notre propos, disons que cette dernière appartient à la famille des méthodes d'analyse factorielle; elle est même identique à une analyse en composantes principales, mais au lieu de travailler sur une matrice des données fournies par les R_{ij}

($i = 1, \dots$ I les variables; $j = 1, \dots$ J les individus) elle travaille sur les $\frac{R_{ij}}{p_{.j}\sqrt{p_{.i}}}$ où $p_{ij} = R_{ij}/[IJ(J+1)/2]$, $p_{i.} = \sum_j p_{ij} = 1/I$ constante puisque les sommes des rangs d'un dégustateur (la variable) est constante, $p_{.j} = R_j/[IJ(J+1)/2]$; c'est-à-dire qu'au coefficient $1/\sqrt{I}$ près nous utilisons pour un produit j donné la valeur relative du rang R_{ij} qui lui est donné par le dégustateur i au rang moyen qui lui est donné par l'ensemble des dégustateurs, ce que nous pouvons schématiquement présenter de la façon suivante :

$$\begin{aligned} &\text{A.C.P.} \rightarrow R_{ij} \\ &\text{A.F.C.} \rightarrow R_{ij}/R_j \end{aligned} \tag{5.3}$$

La formule précédente montre bien qu'un dégustateur i n'intervient plus par le rang qu'il donne au produit j (R_{ij}) mais par le rapport de ce rang au rang moyen donné au produit j (R_{ij}/R_j au coefficient I près).

De même un produit n'est pas jugé par les rangs qui lui sont donnés mais par la valeur relative de ces rangs à cette même somme. En particulier s'il y a concordance parfaite entre les I classements, et si pour simplifier les notations nous supposons que le premier produit ($j = 1$) est toujours classé premier $R_1 = I$ donc $R_{i1} = 1/I$ pour tout i; pour le second ($j = 2$) toujours classé deuxième $R_2 = 2I$, et $R_{12} = 2/2I = 1/I$ pour tout i; si bien que dans ce cas de parfaite concordance tous les produits, ayant les mêmes valeurs, seront tous confondus. Une proximité des produits dans l'analyse traduira une concordance des classements des dégustateurs quels que soient les rangs qui leur ont été donnés.

Comme ici l'analyse est parfaitement symétrique nous pourrons aussi avoir sur le même graphique les dégustateurs. La proximité d'un dégustateur et d'un produit traduira le fait que ce dégustateur a donné un rang relativement élevé à ce produit, qu'il l'a donc relativement mal classé par rapport à la moyenne. Néanmoins l'analyse des correspondances sur le tableau initial présente un sérieux inconvénient : une différence légère sur les vins les mieux classés, c'est-à-dire avec des valeurs R_j faibles, a plus d'effet que sur les vins les plus mauvais. Une idée naturelle couramment employée en A.F.C. consiste à « dédoubler les rangs » : on prend les rangs attribués à chaque produit que nous noterons A^+, B^+, etc... et leur complément que nous noterons A^-, B^-, etc... de telle sorte que

$$A^+ + A^- = B^+ + B^- = \dots = 7$$

Ce simple *codage* présente en plus une aide sérieuse pour l'interprétation : autour des sigles + nous retrouvons les dégustateurs qui ont donné des rangs élevés aux produits correspondants et autour des sigles — ceux qui ont donné des rangs faibles.

Sur la figure 3, A^+ est voisin de 1, 4, 7 qui l'ont placé en dernier, et A^- de 2, 5, 9 qui l'ont mieux classé; un regard attentif sur ce graphique permet en plus de voir des oppositions très fines dans les classements : A et C mal classés quand D et E sont bien classés et inversement sur le premier facteur; opposition de classement pour B et F sur le second facteur. Naturellement nous n'avons introduit aucune information nouvelle mais nous l'avons mieux présentée; ce qu'il faut donc retenir ici est que l'A.F.C. peut fournir une aide précieuse pour juger des classements relatifs mais qu'un bon codage est indispensable; et que de toute façon elle ne s'oppose pas à l'A.C.P. mais qu'elle la complète.

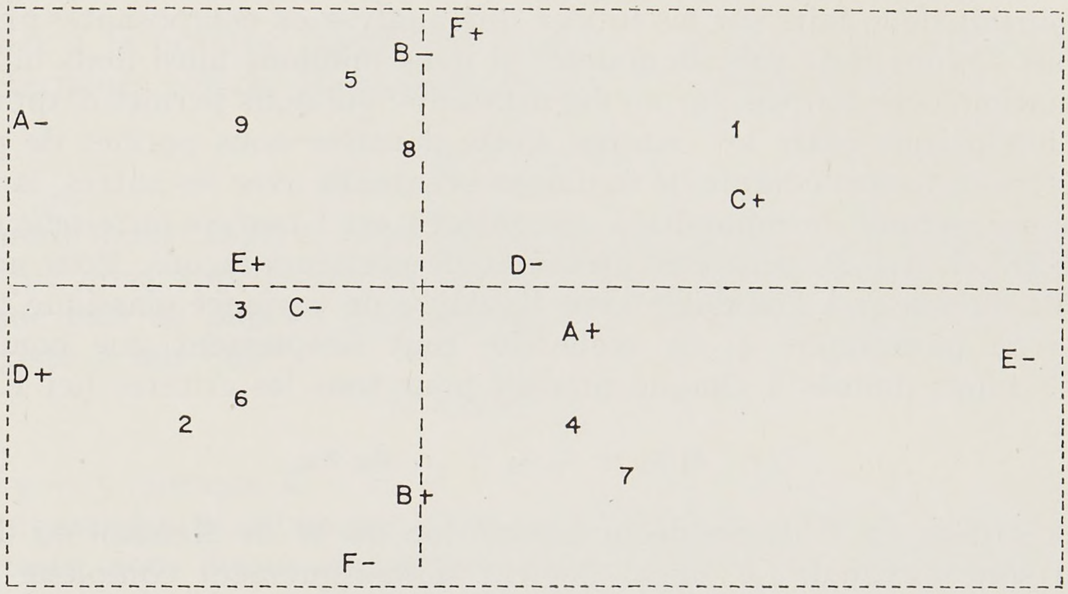


FIG. 3. — *Analyse des correspondances sur les données dédoublées (critère 1) : premier plan factoriel.*

5.4.2. *Analyse factorielle discriminante.*

5.4.2.1. *Principe.* Pour l'instant nous n'avons pas analysé l'ensemble des critères; or, il est assez naturel d'aller plus loin en essayant de faire une analyse globale. L'idée la plus simple consiste à se demander si les rangs moyens, ou les totaux, donnés à chaque produit pour tous les critères ne permettent pas d'avoir une meilleure discrimination entre produits. En effet, on peut penser que la prise en compte de tous les critères *simultanément,* peut permettre une discrimination optimale en tenant compte qu'il existe une certaine redondance entre les critères puisqu'ils sont, à coup sûr, corrélés (tabl. 11).

TABLEAU 11

Total par produit et par critère

Critère / Produit	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	46,5	44,5	43,5	38,5	43,5	37,5	31,0	46,5	39,0	43,0
B	32,5	34,0	32,0	40,5	36,5	39,5	25,5	36,0	33,5	34,5
C	14,0	19,5	21,5	30,5	20,0	31,0	34,0	19,5	28,0	28,0
D	13,0	14,0	25,0	20,0	24,0	23,0	40,0	21,5	24,5	19,0
E	49,5	34,0	21,0	19,5	28,0	20,5	30,5	24,0	25,0	25,0
F	33,5	43,0	46,0	40,0	37,0	37,5	28,0	41,5	39,0	39,5
F(5,40)	49,98 **	9,76 **	6,20 **	4,21 **	3,31 **	2,47 *	0,81	6,93 **	1,55	3,51 **
s	0,67	1,20	1,35	1,45	1,50	1,57	1,71	1,31	1,62	1,48

F : approximation par un F de Fisher-Snedecor [(J — 1)W/(1 — W) = 5W/(1 — W)]
s : écart type résiduel obtenu d'après le tableau 7, comme : carré moyen erreur/(I — 1)(J — 1).

On pourrait donc faire sur les totaux une analyse en composantes principales comme nous l'avons faite précédemment; si nous opérions ainsi nous oublierions une information, celle fournie par les dégustateurs, qui nous permet d'appréhender la liaison intrinsèque entre les critères. Cette dernière nous permet de pondérer chaque critère en tenant compte de sa liaison éventuelle avec les autres; la méthode statistique qui permet de répondre à cet objectif est l'*analyse factorielle discriminante* (A.F.D.). L'A.F.D. peut être présentée de plusieurs façons. Pour notre propos, il suffit de penser à l'analogie avec l'analyse de variance classique que nous avons vue au paragraphe 4; on recherche tout simplement une combinaison linéaire des rangs donnés à chaque produit pour tous les critères (ici K = 10) :

$$y = a_1 x_1 + a_2 x_2 + \dots a_K x_K \qquad (5.4)$$

telle que le critère du F de Snedecor associé (ou du W de Kendall ou du F_R de Friedman) soit maximal. Le calcul devient numériquement complexe puisqu'il s'agit en premier lieu de définir deux matrices de variances et covariances correspondant respectivement aux lignes entre traitements et résiduelle du tableau 7; ainsi 133,61 et 23,89 sont respectivement les premiers termes diagonaux de ces deux matrices que nous noterons *B* et *W* (comme *B*etween et *W*ithin) pour nous

TABLEAU 12

Matrices des coefficients de corrélation intra-produits et inter-produits
(les coefficients sont multipliés par 1 000)

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Wr	1	1 000									
	2	245	1 000								
	3	346	420	1 000							
	4	223	532	451	1 000						
	5	171	295	267	160	1 000					
	6	190	319	158	270	534	1 000				
	7	175	— 27	— 181	— 158	130	145	1 000			
	8	170	569	331	448	615	374	— 74	1 000		
	9	90	446	182	331	646	551	124	762	1 000	
	10	68	— 73	— 165	— 302	51	— 74	— 36	— 13	— 83	1 000
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Br	1	1 000									
	2	834	1 000								
	3	370	780	1 000							
	4	191	652	783	1 000						
	5	682	890	866	720	1 000					
	6	124	586	757	994	697	1 000				
	7	— 609	— 776	— 464	— 707	— 637	— 654	1 000			
	8	578	885	944	804	978	780	— 615	1 000		
	9	395	822	954	912	866	887	— 617	948	1 000	
	10	519	875	876	897	867	866	— 693	930	973	1 000

conformer à la notation habituelle (tabl. 12). Ensuite, les coefficients a_1, ... a_k sont déterminés comme les composantes du vecteur a telles que :

$$B\ a = \mu\ W\ a \qquad (5.5)$$

Comme dans l'analyse en composantes principales on trouve plusieurs composantes que nous appellerons ici facteurs discriminants, chacun permettant d'extraire une part de plus en plus réduite de la discrimination globale des produits. Il en existe g tels que

$$g = \min\ (K,\ J - 1). \qquad (5.6)$$

Ici $g = 5$, puisque $K = 10$ et $J = 6$. On peut même savoir si un facteur discriminant est significatif ou non. Nous n'entrerons pas dans les détails de l'analyse et des tests, nous dirons simplement que la valeur du test doit être comparé à un χ^2 comme indiqué au tableau 13. Il est alors clair que nous pouvons nous contenter de regarder le premier plan formé par les deux premiers facteurs discriminants puisqu'eux seuls sont significatifs. Pour être encore plus près des dix analyses de variance univariates que nous avons faites, notons que la première valeur propre λ_1 correspond au plus grand F possible parmi toutes les combinaisons linéaires des critères, c'est-à-dire aux rangs donnés à chaque produit, par tous les dégustateurs. Il est net que la valeur de $\lambda_1 = 80{,}89$ est supérieure au plus grand F (59,97 pour x_1). On peut alors sans difficulté connaissant les valeurs des coefficients a de la formule (5.4) les appliquer aux rangs moyens obtenus pour chaque critère pour chaque produit, et obtenir les scores pour chaque produit sur les facteurs discriminants (tabl. 14).

TABLEAU 13

Test des g(= 5) *facteurs discriminants*
Les λ_1 correspondent au calcul sur les carrés moyens,
c'est-à-dire que $\mu_i = \lambda_i/(I - 1)$ $(= \lambda_i/8)$

N° Facteur i discriminant	Valeur propre λ_i	ν_i (d.l.)	C_i à comparer à λ^2 $(\nu_i,\ \alpha)$	
1	80,894	50	172,13	**
2	17,478	36	71,17	**
3	3,944	24	24,51	NS
4	1,729	14	9,02	NS
5	0,341	6	1,57	NS

5.4.2.2. *Positions relatives des produits.* Voyons déjà ce que nous fournit l'A.F.D. au niveau des rangs moyens de chaque produit pour les dix critères; il suffit de calculer y_1 (A), y_1 (B), ... y_2 (F) et nous aurons les six produits par leurs coordonnées sur le plan des deux premiers facteurs discriminants.

Si nous centrons et si nous réduisons chaque valeur moyenne (= écart à la moyenne générale de chaque critère, pour notre cas toujours 3,5, et division par

TABLEAU 14

Facteurs discriminants 1 et 2

Critère d'origine (*i*)	*a*) Coefficients		*b*) Coefficients de corrélation		*c*) Représentation dans le 1er plan factoriel	
	Y_1	Y_2	$r(X_i, Y_1)$	$r(X_i, Y_2)$	$r^2(X_i, Y_2)$ %	$r^2(X_i, Y_1) + r^2(X_i, Y_2)$ %
X_1	1,06	— 0,17	0,991	0,135	98,11	99,95
X_2	0,37	— 0,01	0,758	0,633	57,41	97,51
X_3	— 0,41	0,51	0,245	0,920	6,00	90,66
X_4	— 0,28	0,33	0,071	0,934	0,50	87,81
X_5	0,19	— 0,15	0,581	0,764	33,73	92,07
X_6	— 0,23	0,34	0,002	0,934	0,00	87,18
X_7	— 0,36	0,14	— 0,563	— 0,489	31,75	55,68
X_8	— 0,07	0,58	0,462	0,870	21,37	97,03
X_9	0,04	— 0,37	0,268	0,959	7,19	99,18
X_{10}	— 0,14	0,65	0,403	0,890	16,22	95,50

a) Coefficients à appliquer aux rangs réduits (c'est-à-dire divisés par les écarts types *s* du tabl. 11).
b) Coefficients de corrélation entre les deux facteurs discriminants et les dix critères de départ.
c) Représentation des variables dans le premier plan factoriel.

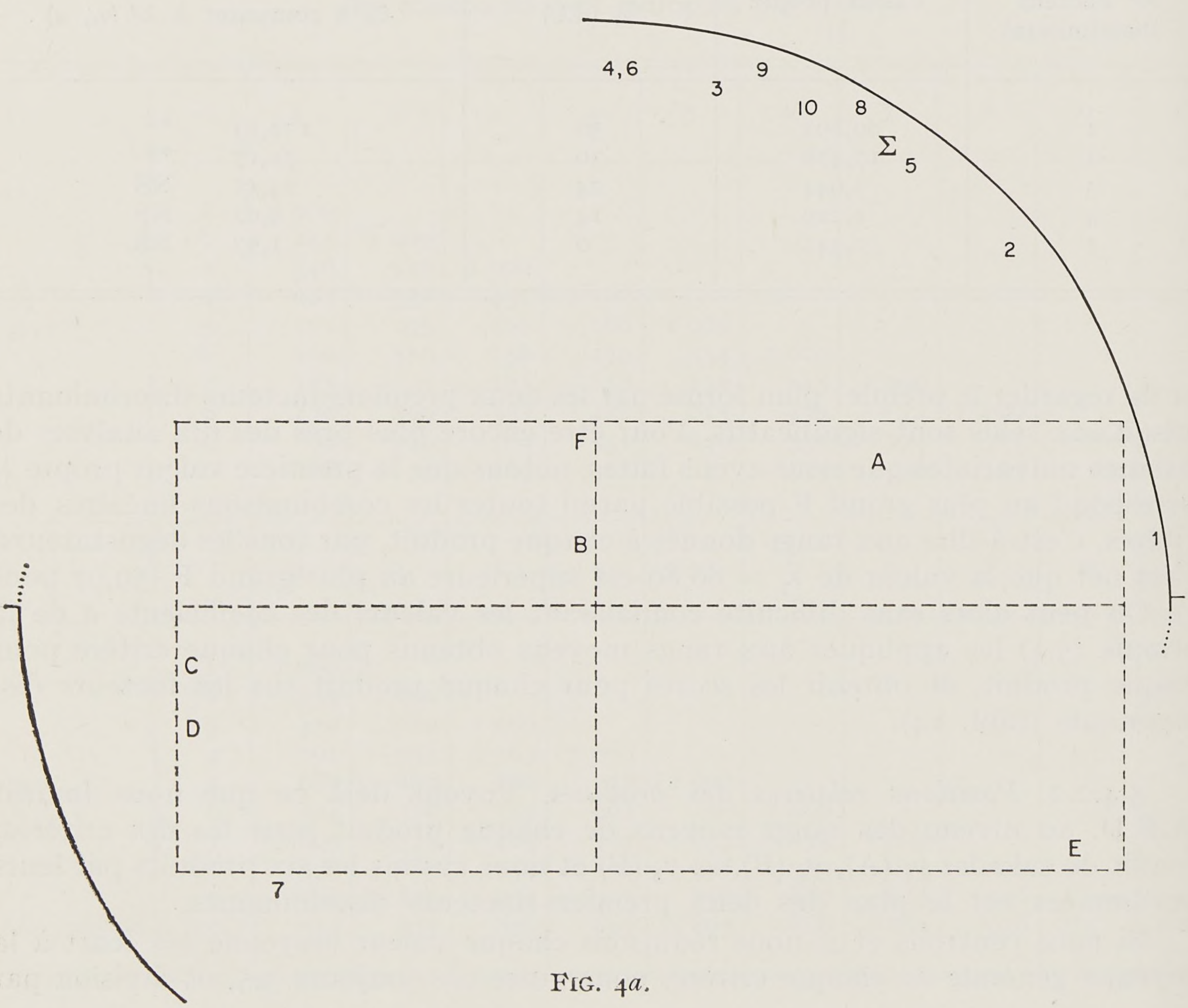


FIG. 4*a*.

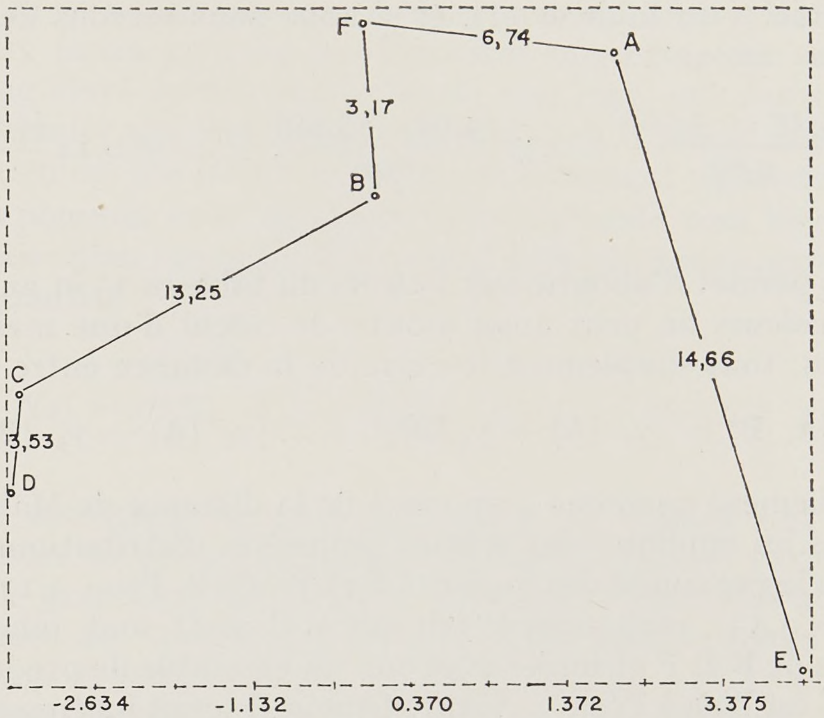


FIG. 4*b*.

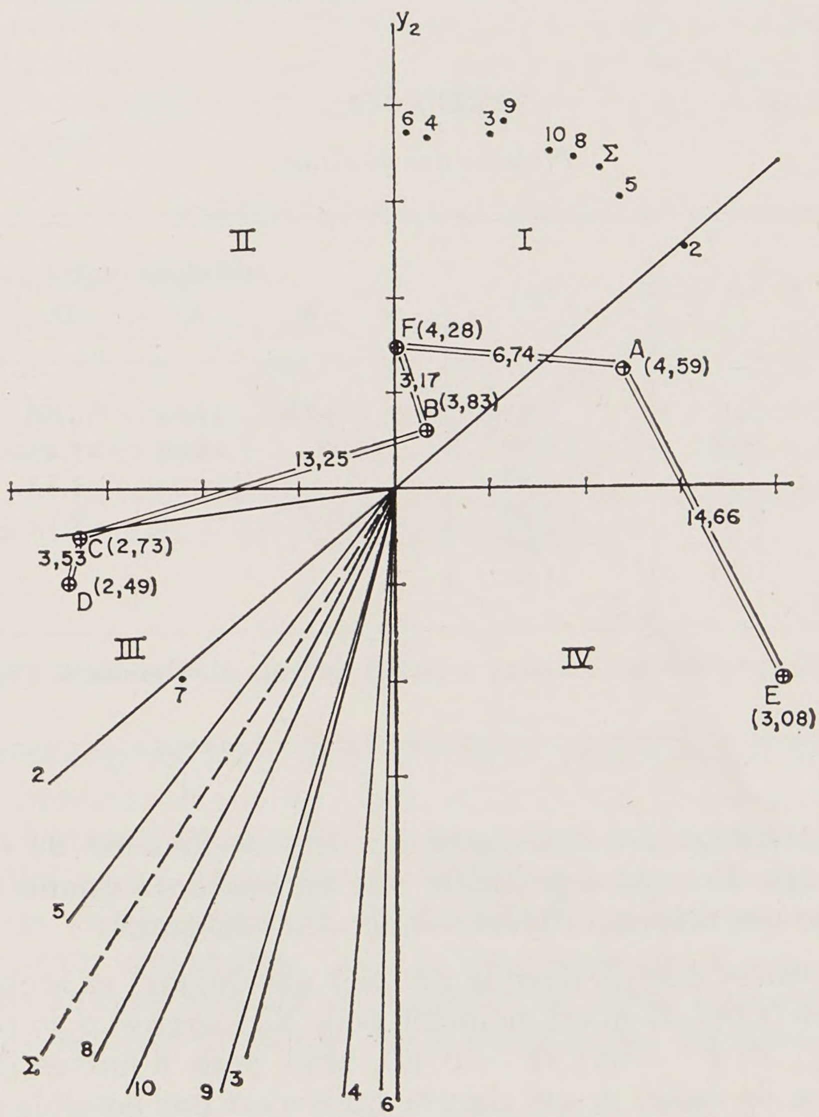


FIG. 4*c*.

FIG. 4. — *Analyse factorielle discriminante sur l'ensemble des données : premier plan factoriel (en surimpression graphe des coefficients de corrélation de critère × Facteur discriminant).*
c) entre parenthèses après chaque vin : valeur de Σ.

l'écart type résiduel s du tableau 11), et si nous nous servons des coefficients du tableau 14a nous avons :

$$Y_1\ (A) = 1{,}06\,\frac{(5{,}17 - 3{,}50)}{0{,}67} + 0{,}37\,\frac{(4{,}94 - 3{,}50)}{1{,}20} + \ldots - 0{,}14\,\frac{(4{,}78 - 3{,}5)}{1{,}48}$$
$$= 2{,}42$$

etc... ce qui nous permet d'aboutir aux valeurs du tableau 15 et au graphique de la figure 4. A ces valeurs on peut aussi ajouter le calcul d'une mesure de distance entre les produits; tout simplement le carré de la distance entre A et B est

$$d^2\ (A, B) = [y_1\ (A) - y_1\ (B)]^2 + \ldots [y_5\ (A) - y_5\ (B)]^2.$$

Il est formellement analogue à un carré de la distance de Mahalanobis, même si on ne peut pas lui appliquer les mêmes propriétés distributionnelles. Tout ceci nous montre bien la proximité des produits B et F [d^2 (B, F) = 3,17], des produits C et D [d^2 (C, D) = 3,53]; mais aussi le fait que si C et D sont relativement isolés, A est assez voisin de B et F et forme avec eux un ensemble de produits assez homogène, alors que E est bien à l'écart. Naturellement il serait intéressant d'interpréter ces différences en fonction des critères de départ; aussi est-il bon de calculer les coefficients de corrélation entre les facteurs discriminants et les critères de départ.

TABLEAU 15

Position des produits

Produits	Y_1	Y_2	Distances entre produits A	B	C	D	E	F
A	2,42	1,36	0	7,66	37,20	39,69	14,66	6,74
B	0,08	0,62		0	13,25	17,45	24,33	3,17
C	— 3,25	— 0,48			0	3,53	57,34	15,80
D	— 3,39	— 0,99				0	58,59	18,95
E	4,13	— 2,00					0	29,51
F	0,01	1,50						0

Y_1, Y_2 : Scores des produits sur les deux premiers facteurs discriminants. Distances entre toutes les paires de produits.

5.4.2.3. *Interprétation des axes factoriels.* Les coefficients de corrélation sont ceux du tableau 14*b*. Ils sont à première vue surprenants quand on les compare aux coefficients de ces mêmes critères sur les axes factoriels :

. *X_1 est fortement corrélée* avec le premier axe (0,991) et le coefficient correspondant était élevé (1,06). Il en est de même pour X_2 (0,758 et 0,37 respectivement), X_5 (0,581 et 0,19), X_7 (— 0,653 et — 0,36). Mais pour d'autres (X_3, X_4, X_6, X_8, X_{10}) il y a inversion de signe; ce qui signifie qu'il n'est pas possible « d'interpréter » un axe factoriel discriminant aussi simplement qu'une composante principale.

. *La même remarque s'applique* pour l'interprétation du second axe factoriel discriminant, de sorte que si nous indiquons sur la figure 4*c* les directions opposées

des 10 critères, nous avons une vue synthétique de l'interprétation du premier plan discriminant (nous prenons les directions opposées, car nous avons utilisé les rangs, un rang élevé correspond à un vin mal jugé; une forte corrélation d'un critère avec le premier axe signifie que les vins C et D placés dans cette direction sont bien classés sur cet axe et que le critère est fortement représentatif de ces vins).

Enfin, nous pouvons nous demander si les variables sont bien représentées ou non dans le premier plan factoriel. Pour cela il suffit de remarquer que pour chaque variable i la quantité

$$\sum_{k=1}^{5} r^2(X_i, Y_k) = r^2(X_i, Y_1) + r^2(X_i, Y_2) + \ldots r^2 (X_i, Y_5) = 1 \quad (5.7)$$

donc le carré du coefficient de corrélation entre la variable i et un axe factoriel discriminant mesure la valeur de la représentation de cette variable par cet axe. Si on porte sur le graphique de la figure 4 les points variables avec comme coordonnées les valeurs des coefficients de corrélation, plus ces points seront voisins du cercle de rayon 1, meilleure sera la représentation sur ce plan. C'est ce qui apparaît au tableau 14*c* où l'on voit que toutes les variables sont bien représentées dans le premier plan sauf X_7.

. *Dans la mesure où le rang moyen* sur l'ensemble des critères peut être un bon indicateur du jugement, nous l'avons reporté sur la figure. Nous avons aussi les coefficients de corrélation entre cette moyenne et les axes discriminants; ils valent respectivement :

$$0{,}532 \text{ avec } Y_1 \text{ et } 0{,}846 \text{ avec } Y_2.$$

Il est clair que les vins C et D sont les mieux classés et se trouvent dans le troisième quadrant. A, B, F mal classés sont au contraire dans le premier. La position de E est plus délicate à interpréter : assez bien classé, il a toutefois la plus grande valeur de Y_1; il est en effet très mal jugé pour X_1 fortement corrélé avec Y_1, mais il est très bien jugé pour les critères X_3, X_4, X_6, X_9, c'est-à-dire pour ses qualités d'olfaction, de finesse d'arôme et de consommation immédiate; ah! s'il avait une couleur plus attirante, il atteindrait des sommets.

5.4.3. *Analyse procustéenne.*

5.4.3.1. *Étalonnage du jury.* Pour l'instant nous n'avons porté notre attention que sur les produits et sur les comparaisons que l'on pouvait faire sur eux; nous allons, pour terminer cet inventaire des méthodes, nous attacher aux membres du jury c'est-à-dire aux I dégustateurs. Dans l'analyse factorielle des correspondances nous avons vu apparaître les dégustateurs sur le même graphique que les produits, ceci pour un seul critère; nous aurions pu analyser tous les critères de la même façon; nous aurions pu aussi les analyser en même temps et voir apparaître sur les graphiques des axes factoriels, les jugements des dégustateurs pour chaque critère.

Dans l'analyse factorielle discriminante les dégustateurs « disparaissaient » de l'analyse dans la mesure où, n'ayant que la possibilité de donner des rangs aux produits, leur variabilité n'était pas mise en évidence. Il serait toutefois intéressant de mesurer leur variabilité ne serait ce que pour « *étalonner le jury* ».

5.4.3.2. *Principe: Une mesure de ressemblance entre dégustateurs.*

Imaginons un instant que deux dégustateurs donnent à trois produits des notes pour deux critères (pour l'instant nous ne supposons pas que ces notes soient des rangs). Dans un plan dont les axes représentent les critères, chaque produit est défini par sa position :

— pour le premier dégustateur α (2, 4), β (5, 2), γ (3, 1),
— pour le second dégustateur α' (4, 4), β' (3, 2), γ' (1, 1).

Chaque dégustateur traduit donc sa propre configuration; pour trois produits et deux critères nous avons deux triangles dans le plan. Nous disons que pour mesurer la ressemblance entre les deux dégustateurs, il faut « ajuster » les deux triangles; cet ajustement se fait en trois temps (fig. 5).

a) On fait *coïncider* les centres des triangles : ce faisant on élimine le fait qu'un des dégustateurs peut n'utiliser qu'une partie de l'échelle (rappelons que pour l'instant les données prennent des valeurs sur une échelle et pas obligatoirement des rangs).

b) On *dilate* les deux triangles de façon à ce que la somme des carrés de chaque configuration soit alors la même pour chaque dégustateur. Ce faisant, nous éliminerons le fait que chaque dégustateur n'utilise pas la variabilité permise par l'échelle de chaque critère.

c) On effectue une *rotation* pour ajuster l'un à l'autre les deux triangles de telle sorte que la somme des carrés des distances entre les sommets qui se correspondent soit minimum; il s'agit ici de $\alpha\alpha'^2 + \beta\beta'^2 + \gamma\gamma'^2 = D^2$.

Cette quantité fournit un *indice* qui est une mesure de la ressemblance entre les deux dégustateurs; plus il est faible, plus les dégustateurs se ressemblent, plus il est grand, plus ils sont différents.

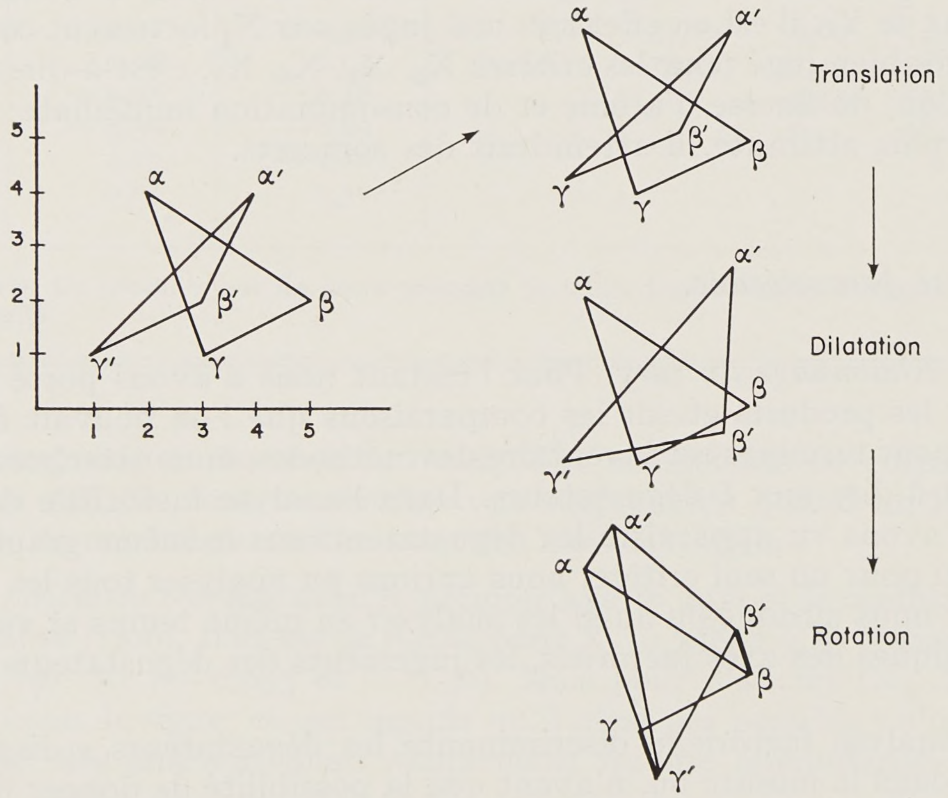


FIG. 5. — *Analyse procustéenne : présentation schématique des différentes étapes (deux dégustateurs jugeant trois produits selon deux critères).*

5.4.3.3. *Une matrice de ressemblance.*

Si maintenant nous prenons en compte tous les critères, chaque juge dans un espace à K dimensions donne sa propre configuration. Il est possible de faire subir la transformation que nous avons détaillée pour trois produits et deux critères, aux six produits et aux dix critères pour obtenir une mesure de la ressemblance de deux configurations, c'est-à-dire de deux juges. Cette opération peut, bien sûr, s'étendre à tous les couples de juges, ce qui nous permet de calculer une matrice de ressemblance entre tous les juges (tabl. 16); nous disons bien « *ressemblances* » et non « *distances* » dans la mesure où les indices ne vérifient pas l'inégalité triangulaire, ce qui permettrait dans ce cas de les appeler distances (CAILLEZ et PAGES, 1976).

TABLEAU 16

Ressemblances entre juges obtenus par l'analyse procustéenne

Juge	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	0								
2	.421	0							
3	.267	.739	0						
4	.224	.553	.237	0					
5	.210	.337	.277	.349	0				
6	.409	.454	.424	.446	.344	0			
7	.270	.254	.359	.406	.173	.396	0		
8	.354	.608	.270	.461	.154	.578	.374	0	
9	.365	.889	.304	.310	.547	.460	.833	.495	0

5.4.4. *Analyse des coordonnées principales.*

Ce tableau 16 est déjà instructif par lui-même puisque nous voyons que les juges 5 et 8 sont peu distants (0,154) alors que les juges 2 et 9 le sont beaucoup plus (0,889); mais nous pouvons aller encore plus loin et représenter la configuration des 9 dégustateurs de façon plus parlante en effectuant sur elle une analyse factorielle analogue à l'analyse en composantes principales : une *analyse des coordonnées principales* (GOWER, 1966). Il suffit de projeter la configuration des neuf points sur un espace qui la déforme le moins possible, c'est ce que nous voyons sur la figure 6. Il est bien clair que certains juges se ressemblent alors que d'autres ont des jugements très différents. Les juges 8 et 5 se retrouvent assez voisins, mais 2 et 9 sont opposés sur l'axe qui traduit la plus grande variabilité. En fait, cette figure traduit sur un plan la variabilité globale des juges, mais il se peut que des paires apparaissent proches alors que, dans l'espace, elles ne le sont pas; aussi est-il prudent de regarder les autres plans avant de conclure à la ressemblance ou à la dissemblance des membres du jury. On peut quelquefois s'en dispenser en traçant sur le plan des deux premiers axes *le chemin le plus court* entre tous les dégustateurs (GOWER et ROSS, 1969); ce tracé surimposé au premier plan factoriel donne une bonne idée de la distorsion spatiale. Le dégustateur 6 est relié à 5 et non à 1 qui paraît plus proche sur le plan, ce qui serait logique si nous regardions la troisième dimension où 6 et 1 sont très éloignés. Il en est de même du triplet

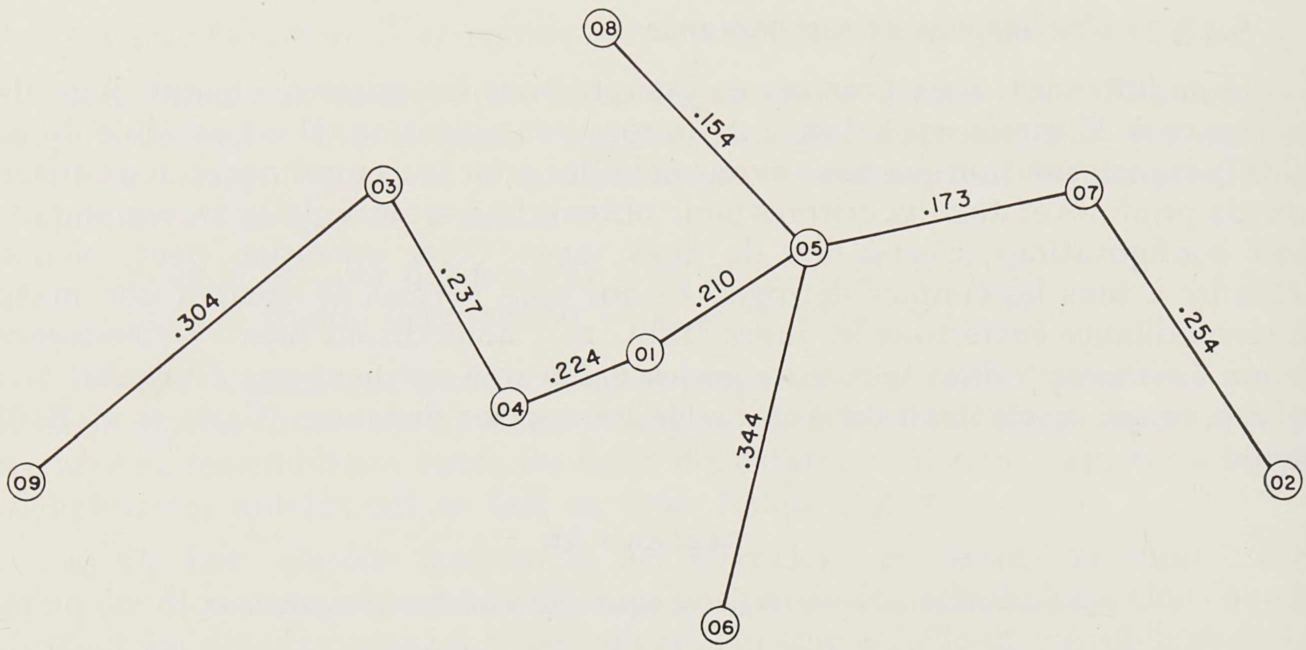


FIG. 6. — *Analyse des coordonnées principales sur la matrice des ressemblances des dégustateurs : premier plan factoriel (en surimpression arbre de longueur minimum)*

8,3,5. Ce tracé a en outre l'avantage de déceler le rôle central joué par le cinquième dégustateur qui est le plus proche voisin des dégustateurs 8,7,1 et 6; ce dégustateur pourrait sans doute être considéré comme *l'élément le plus représentatif* du jury.

On pourra trouver d'autres renseignements sur l'analyse procustéenne dans GOWER (1971, 1975) et SCHONEMANN et CARROLL (1970) pour l'aspect méthodologique, dans BANFIELD et HARRIES (1975) pour une application à l'étude de carcasses de bovins et dans NELDER (1973) pour un programme sur ordinateur grâce à la directive « ROTATE » de GENSTAT.

VI. — Conclusions

Au terme de cet inventaire, nous pensons avoir montré que des données assez couramment obtenues dans des séances de dégustation sont susceptibles d'être utilisées de façon plus complète qu'elles ne le sont généralement, et encore nous n'avons pas mentionné toute une série de méthodes connues sous le nom d'analyse de préférence, méthodes qui connaissent depuis peu un développement très intéressant (LEMAIRE, 1976). Il faut à notre avis dégager trois aspects essentiels de cette longue présentation :

a) *La qualité* des données de départ : elle conditionne naturellement les études ultérieures. Mais, à partir du moment où l'ordre obtenu par chaque dégustateur est obtenu indépendamment de celui obtenu par les autres, à partir du moment où le choix qui en découle n'a pas été biaisé, il faut que les expérimentateurs soient convaincus qu'il n'y a pas une « statistique noble » (sous-entendu la statistique du modèle gaussien) et une « statistique au rabais ». Des rangs sont susceptibles d'un traitement rigoureux, sous réserve bien sûr de leur validité.

b) *L'approche inférentielle,* qui aboutit à un test statistique, c'est-à-dire à une prise de décision n'est pas incompatible d'une *approche plus descriptive;* cette dernière vient souvent avant la première, voire en la complétant si l'approche inférentielle n'est pas possible ou si elle est trop compliquée.

c) *L'interprétation des résultats des jurys de dégustation* par des techniques statistiques très élaborées ne doit pas servir à dissimuler ou *a fortiori*, justifier des insuffisances dans la conception, la préparation et la réalisation d'analyses organoleptiques.

L'appréciation objective de l'intérêt qualitatif d'une technologie originale ou d'un produit nouveau repose sur un ensemble de démarches complexes et liées (SAUVAGEOT et TOURAILLE, 1976; AFNOR, 1976). De la formation des jurés au choix de la statistique appropriée, il est nécessaire qu'un même souci de rigueur soit présent à toutes les étapes de la chaîne.

Reçu pour publication en octobre 1977.

Remerciements

Nous tenons à remercier Colette ROUX qui a réalisé la majorité des calculs sur ordinateur et Guy BERNARD qui a appliqué les directives spécifiques de GENSTAT.

Summary

Survey of the methods of analysis of taste panel data

In this paper a survey of the methods of analysis of taste panel data is given. With only one variable Friedman's two-way variance analysis is completed with some specific tests: multiple comparisons, prefixed order; the links between the various statistics are shown. With several variables, a lot of classical methods of multidimensional analysis are proposed to take into account the entire information; beside principal components analysis, correspondence analysis, canonical variate analysis some methods such as procustean analysis, principal coordinate analysis are described to complete the whole set of statistical tools. The importance is given to similarity and dissimilarity between methods to give to the user the possibility to choose the best method well fitted to his own problem.

Références bibliographiques

AFNOR, 1976. Analyse sensorielle des produits alimentaires. Méthodologie générale (3e avant-projet présenté par le Royaume-Uni). *Commission d'analyse sensorielle, V 09 inter-doc 76.* AFNOR, Paris.

ANDERSON V. L., MC LEAN R. A., 1974. Design of experiments, a realistic approach, M. Dekker, New York.

BANFIELD C. F., HARRIES J. M., 1975. A technique for comparing judges performances in sensory tests. *J. Fd. Technol.*, **10**, 1-10.

CAILLEZ F., PAGES J. P., 1976. Introduction à l'analyse des données, SMASH, Paris.

COCHRAN W. G., 1950. The comparison of percentages in matched samples. *Biometrika*, **37**, 256-266.

DOWNTON F., 1976. Nonparametric tests for block experiments. *Biometrika*, **63** (1), 137-142.

DURBIN J., 1951. Incomplete blocks in ranking experiments. *Br. J. Psychology*, **402**, 85-90.

FRIEDMAN M., 1937. The use of ranks to avoid the assumption of normality implicit in the analysis of variance. *J.A.S.A.*, **32**, 675-701.

GIBBONS J. D., 1971. Nonparametric statistical inference, Mc Graw Hill, New York.

GOWER J. C., 1966. Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. *Biometrika*, **53** (3-4), 325-338.

GOWER J. C., 1971. Statistical methods of comparing different multivariate analyses of the same data. In HODSON, KENDALL, TAUTU, 138-149, Mathematics in the archaelogical and historical sciences, Edinburgh Univ-Press,. Edingburgh.

GOWER J. C., 1975. Generalized procustes analysis. *Psychometrika*, **40** (1), 33-51.

GOWER J. C., ROSS C. J. S., 1969. Minimum spananing trees and simple linkage cluster analysis. *Applied Statistics*, **18** (1), 54-64.

HAJEK J., 1969. Nonparametric statistics, Holden Day, San Francisco.

HODGES J. L. Jr., LEHMANN E. L., 1962. Rank methods for combination of independent experiments in analysis of variance. *A.M.S.*, **33**, 482-497.

HOLLANDER M., WOLFE D. A., 1973. Nonparametric statistical methods, J. Wiley, New York.

KAHAN G., COOPER D., PAPAVASILIOU A., KRAMER A., 1973. Expanded tables for determining significance of differences or ranked data. *Food Technol.*, **27**, 63-69.

KEULS M., 1952. The use of " studentized range " in connection with an analysis of variance. *Euphytica*, **1**, 112-122.

KRAMER A., 1956. A quick rank test for significance of differences in multiple comparisons. *Food Technol.*, **10**, 391-392.

KRAMER A., 1963. Revised tables for determining significance of differences. *Food Technol.*, **17**, 1596-1597.

KRAMER A., KAHAN G., COOPER D., PAPAVASILIOU A., 1974. A non parametric ranking method for the statistical evaluation of sensory data. *Chemical Senses and Flavor*, **1**, 121-133.

LEBART L., FENELON J. P., 1975. Statistique et informatique appliquées, Dunod, Paris.

LEHMANN E. L., 1975. Nonparametrics : statistical methods based on ranks, Holden Day, San Francisco.

LEMAIRE J., 1976. Agrégation typologique de données de préférences. Congrès Stat. Européens, Grenoble.

MC DONALD B. J., THOMPSON W. A. Jr., 1967. Rank sum multiple comparisons in one-and two way classifications. *Biometrika*, **54**, 487-497.

MILLER R. J. Jr., 1966. Simultaneous statistical inference, Mc. Graw Hill, New York.

NELDER J. A. Members of the Rothamsted statistic Dpt (1973) " GENSTAT " reference manual. Scientific and Social Sciences Program Library. Univ. of Edingburgh.

NEWMAN D., 1939. The distribution of range in samples from a normal population expressed in terms of an independant estimate of standard deviation. *Biometrika*, **31**, 20-30.

PAGE E. B., 1963. Ordered hypotheses for multiple treatments: a significance test for linear ranks. *J.A.S.A.*, **58**, 216-230.

SAUVAGEOT F., TOURAILLE C., 1976. *a*) Les caractéristiques organoleptiques du saucisson sec obtenu dans les trois séries expérimentales. *b*) Comparaison entre deux groupes d'évaluation sensorielle travaillant sur le saucisson. *L'alimentation et la Vie*, **64**, 131-159.

SCHONEMANN P. H., CARROLL R. M., 1970. Fitting one matrix to another under choice of a central dilatation and a rigid motion. *Psychometrika*, **35**, 245-256.

SIEGEL S., 1956. Nonparametric statistics for the behavioral sciences, Mc Graw. Hill, New York.

SNEDECOR G. W., COCHRAN W. G., 1971. Méthodes statistiques, A.C.T.A., Paris.

THOMPSON W. A. Jr., WILLKE T. A., 1963. On an extreme rank some test for outliers. *Biometrika*, **50**, 375-383.

ANNEXE 1. — *Liste complète des données*

i	j	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	x_6	x_7	x_8	x_9	x_{10}
1	1	6.0	6.0	4.0	6.0	5.5	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
1	2	4.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	2.5	5.5	5.0	2.5
1	3	5.0	5.0	4.5	3.5	1.5	1.0	1.0	3.5	1.5	6.0
1	4	6.0	5.0	6.0	4.0	5.5	4.0	6.0	5.5	4.0	6.0
1	5	4.5	6.0	5.0	6.0	5.0	4.0	1.5	6.0	6.0	6.0
1	6	5.0	2.0	3.0	1.0	5.0	1.0	2.0	4.0	2.5	6.0
1	7	6.0	6.0	6.0	5.5	6.0	6.0	3.0	6.0	5.0	2.0
1	8	5.0	5.0	5.0	3.0	4.5	5.0	4.0	5.0	4.0	5.0
1	9	4.5	4.0	4.5	4.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	3.5
2	1	3.0	3.0	1.0	5.0	3.0	5.0	5.0	3.0	3.0	3.0
2	2	4.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	2.5	5.5	5.0	1.0
2	3	3.5	3.5	4.5	5.5	5.0	4.0	2.5	6.0	6.0	4.0
2	4	4.0	4.0	4.0	3.0	3.5	3.0	4.0	3.0	3.0	4.0
2	5	3.0	3.0	3.5	3.0	3.5	5.0	1.5	5.0	4.5	5.0
2	6	4.0	3.0	5.0	4.0	6.0	5.0	5.0	2.0	2.5	4.0
2	7	4.5	5.0	5.0	5.5	3.0	5.0	1.0	5.0	2.0	6.0
2	8	3.0	4.0	1.0	6.0	4.5	4.0	1.0	4.0	5.0	4.0
2	9	3.0	3.0	2.5	3.0	2.5	3.0	3.0	2.5	2.5	3.5
3	1	2.0	2.0	2.0	4.0	1.0	4.0	4.0	2.0	2.0	2.0
3	2	1.0	3.5	4.0	4.0	3.5	4.0	4.0	4.0	5.0	2.5
3	3	1.0	2.0	2.5	2.0	3.5	5.5	5.5	1.0	4.5	3.0
3	4	2.0	2.0	3.0	6.0	1.5	2.0	2.5	1.5	2.0	2.0
3	5	2.0	2.0	2.0	2.0	3.5	3.0	4.0	4.0	4.5	3.0
3	6	1.0	1.0	1.0	2.0	1.0	6.0	1.0	1.0	1.0	5.0
3	7	2.0	2.5	4.0	4.0	2.0	2.0	4.0	2.0	5.0	4.0
3	8	2.0	3.0	2.0	5.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
3	9	1.0	1.5	1.0	1.5	1.0	1.5	6.0	1.0	1.0	3.5
4	1	1.0	1.0	5.0	2.0	2.0	2.0	3.0	1.0	1.0	1.0
4	2	2.0	1.5	3.0	2.0	3.5	3.0	6.0	2.5	2.5	4.5
4	3	2.0	1.0	1.0	1.0	3.5	5.5	5.5	2.0	4.5	1.0
4	4	1.0	1.0	2.0	2.0	1.5	1.0	2.5	1.5	1.0	1.0
4	5	1.0	1.0	3.5	4.5	2.0	2.0	5.0	2.0	2.0	1.0
4	6	2.0	4.0	2.0	3.0	3.0	3.0	6.0	5.0	6.0	1.0
4	7	1.0	1.0	2.0	2.0	4.0	3.0	6.0	3.0	3.0	5.0
4	8	1.0	2.0	4.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	1.0
4	9	2.0	1.5	2.5	1.5	2.5	1.5	4.0	2.5	2.5	3.5
5	1	4.0	4.0	3.0	1.0	5.5	1.0	1.0	4.0	4.0	4.0
5	2	6.0	1.5	1.0	1.0	2.0	1.0	1.0	1.0	1.0	6.0
5	3	6.0	3.5	2.5	3.5	6.0	2.5	4.0	5.0	3.0	2.0
5	4	5.0	6.0	1.0	1.0	5.5	5.0	5.0	5.0	4.0	5.0
5	5	6.0	4.0	1.0	1.0	1.0	1.0	6.0	1.0	1.0	2.0
5	6	6.0	4.0	5.0	5.0	2.0	4.0	4.0	3.0	5.0	2.0
5	7	4.5	4.0	1.0	1.0	1.0	1.0	2.0	1.0	1.0	1.0
5	8	6.0	1.0	3.0	1.0	1.0	1.0	6.0	1.0	1.0	2.0
5	9	6.0	5.0	4.5	5.0	4.0	4.0	1.5	4.0	4.0	1.0
6	1	5.0	6.0	3.0	5.0	4.0	3.0	2.0	5.0	5.0	5.0
6	2	3.0	3.5	2.0	3.0	1.0	2.0	5.0	2.5	2.5	4.5
6	3	3.5	6.0	6.0	5.5	1.5	2.5	2.5	3.5	1.5	5.0
6	4	3.0	3.0	5.0	5.0	3.5	6.0	1.0	5.5	6.0	3.0
6	5	4.5	5.0	6.0	4.5	6 0	6.0	3.0	3.0	3.0	4.0
6	6	3.0	6.0	6.0	6.0	4.0	2.0	3.0	6.0	4.0	3.0
6	7	3.0	2.5	3.0	3.0	5.0	4.0	5.0	4.0	5.0	3.0
6	8	4.0	6.0	6.0	4.0	6.0	6.0	5.0	6.0	6.0	6.0
6	9	4.5	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	1.5	6.0	6.0	6.0

i = code produit. 1 = A, 2 = B, . . .
j = code dégustateur.
$x_{10}, \ldots x_1$ = critère de dégustation, voir texte paragraphe 1.

ANNEXE 2. — *Tables de Kramer aux seuils 1 p. cent, 5 p. cent, 10 p. cent, 15 p. cent, 20 p. cent*
sans traitement préfixé (table *a*)
avec traitement préfixé (table *b*)

TABLE DE KRAMER A 1 P. CENT

TRAITEMENT RÉPÉTITION	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2	2-4	2-6	2- 8	2-10	2-12	2-14	2-16	2-18	2-20	2-22	2-24
3	3-6	3-9	3-12	3-15	3-18	3-21	3-24	3-27	3-30	4-32	4-35
4	4-8	4-12	4-16	5-19	5-23	5-27	6-30	6-34	6-38	6-42	7-45
5	5-10	5-15	6-19	7-23	7-28	8-32	8-37	9-41	9-46	10-50	10-55
6	6-12	7-17	8-22	9-27	9-33	10-38	11-43	12-48	13-53	13-59	14-64
7	7-14	8-20	10-25	11-31	12-37	13-43	14-49	15-55	16-61	17-67	18-73
8	9-15	10-22	11-29	13-35	14-42	16-48	17-55	19-61	20-68	21-75	23-81
9	10-17	12-24	13-32	15-39	17-46	19-53	21-60	22-68	24-75	26-82	27-90
10	11-19	13-27	15-35	18-42	20-50	22-58	24-66	26-74	28-82	30-90	32-98
11	12-21	15-29	17-38	20-46	22-55	25-63	27-72	30-80	32-89	34-98	37-106
12	14-22	17-31	19-41	22-50	25-59	28-68	31-77	33-87	36-96	39-105	42-114
13	15-24	18-34	21-44	25-53	28-63	31-73	34-83	37-93	40-103	43-113	46-123

TABLE DE KRAMER A 1 P. CENT, AVEC UN TRAITEMENT PRÉFIXÉ

TRAITEMENT RÉPÉTITION	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2	2-4	2-6	2-8	2-10	2-12	2-14	2-16	2-18	2-20	3-21	3-23
3	3-6	3-9	3-12	4-14	4-17	4-20	5-22	5-25	5-28	6-30	6-33
4	4-8	4-12	5-15	6-18	6-22	7-25	8-28	8-32	9-35	10-38	10-42
5	5-10	6-14	7-18	8-22	9-26	10-30	11-34	12-38	13-42	14-46	15-50
6	6-12	8-16	9-21	10-26	12-30	13-35	14-40	16-44	17-49	18-54	20-58
7	8-13	9-19	11-24	12-30	14-35	16-40	18-45	19-51	21-56	23-61	25-66
8	9-15	11-21	13-27	15-33	17-39	19-45	21-51	23-57	25-63	28-68	30-74
9	10-17	12-24	15-30	17-37	20-43	22-50	25-56	27-63	30-69	32-76	35-82
10	11-19	14-26	17-33	20-40	23-47	25-55	28-62	31-69	34-76	37-83	40-90
11	13-20	16-28	19-36	22-44	25-52	29-59	32-67	35-75	39-82	42-90	45-98
12	14-22	18-30	21-39	25-47	28-56	32-64	36-72	39-81	43-89	47-97	50-106
13	15-24	19-33	23-42	27-51	31-60	35-69	39-78	44-86	48-95	52-104	56-113

TABLE DE KRAMER A 5 P. CENT

TRAITEMENT RÉPÉTITION	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2	2-4	2-6	2- 8	2-10	2-12	2-14	2-16	2-18	2-20	2-22	2-24
3	3-6	3-9	3-12	4-14	4-17	4-20	4-23	5-25	5-28	5-31	5-34
4	4-8	5-11	5-15	6-18	6-22	7-25	7-29	8-32	8-36	8-40	9-43
5	5-10	6-14	7-18	8-22	9-26	9-31	10-35	11-39	12-43	12-48	13-52
6	7-11	8-16	9-21	10-26	11-31	12-36	13-41	14-46	15-51	17-55	18-60
7	8-13	10-18	11-24	12-30	14-35	15-41	17-46	18-52	19-58	21-63	22-69
8	9-15	11-21	13-27	15-33	17-39	18-46	20-52	22-58	24-64	25-71	27-77
9	11-16	13-23	15-30	17-37	19-44	22-50	24-57	26-64	28-71	30-78	32-85
10	12-18	15-25	17-33	20-40	22-48	25-55	27-63	30-70	32-78	34-86	37-93
11	13-20	16-28	19-36	22-44	25-52	28-60	31-68	34-76	36-85	39-93	42-101
12	15-21	18-20	21-39	25-47	28-56	31-65	34-74	38-82	41-91	44-100	47-109
13	16-23	20-32	24-41	27-51	31-60	35-69	38-79	42-88	45-98	49-107	52-117

TABLE DE KRAMER A 5 P. CENT, AVEC UN TRAITEMENT PRÉFIXÉ

TRAITEMENT RÉPÉTITION	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2	2-4	2-6	2- 8	3- 9	3-11	3-13	4-14	4-16	4-18	5-19	5-21
3	3-6	4-8	4-11	5-13	6-15	6-18	7-20	8-22	8-25	9-27	10-29
4	4-8	5-11	6-14	7-17	8-20	9-23	10-26	11-29	13-31	14-34	15-37
5	6-9	7-13	8-17	10-20	11-24	13-27	14-31	15-35	17-38	18-42	20-45
6	7-11	9-15	11-19	12-24	14-28	16-32	18-36	20-40	21-45	23-49	25-53
7	8-13	10-18	13-22	15-27	17-32	19-37	22-41	24-46	26-51	28-56	30-61
8	10-14	12-20	15-25	17-31	20-36	23-41	25-47	28-52	31-57	33-63	36-68
9	11-16	14-22	17-28	20-34	23-40	26-46	29-52	32-58	35-64	38-70	41-76
10	12-18	16-24	19-31	23-37	26-44	30-50	33-57	37-63	40-70	44-76	47-83
11	14-19	18-26	21-34	25-41	29-48	33-55	37-62	41-69	45-76	49-83	53-90
12	15-21	19-29	24-36	28-44	32-52	37-59	41-67	45-75	50-82	54-90	58-98
13	17-22	21-31	26-39	31-47	35-56	40-64	45-72	50-80	54-89	59-97	64-105

TABLE DE KRAMER A 10 P. CENT.

TRAITEMENT RÉPÉTITION	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2	2-4	2-6	2-8	2-10	2-12	2-14	2-16	2-18	2-20	3-21	3-23
3	3-6	3-9	4-11	4-14	4-17	5-19	5-22	5-25	5-28	6-30	6-33
4	4-8	5-11	6-14	6-18	7-21	7-25	8-28	9-31	9-35	10-38	10-42
5	6-9	7-13	8-17	9-21	10-25	10-30	11-34	12-38	13-42	14-46	15-50
6	7-11	8-16	10-20	11-25	12-30	13-35	15-39	16-44	17-49	18-54	19-59
7	8-13	10-18	12-23	13-29	15-34	17-39	18-45	20-50	21-56	23-61	24-67
8	10-14	12-20	14-26	16-32	18-38	20-44	22-50	24-56	25-63	27-69	29-75
9	11-16	14-22	16-29	18-36	21-42	23-49	25-56	28-62	30-69	32-76	34-83
10	12-18	15-25	18-32	21-39	24-46	26-54	29-61	32-68	34-76	37-83	39-91
11	14-19	17-27	20-35	23-43	27-50	30-58	33-66	36-74	39-82	42-90	44-99
12	15-21	19-29	22-38	26-46	30-54	33-63	36-72	40-80	43-89	46-98	50-106
13	17-22	21-31	25-40	29-49	32-59	36-68	40-77	44-86	48-95	51-105	55-114

TABLE DE KRAMER A 10 P. CENT, AVEC UN TRAITEMENT PRÉFIXÉ.

TRAITEMENT RÉPÉTITION	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2	2-4	2-6	3-7	3-9	4-10	4-12	5-13	5-15	5-17	6-18	6-20
3	3-6	4-8	5-10	6-12	7-14	7-17	8-19	9-21	10-23	11-25	12-27
4	5-7	6-10	7-13	8-16	10-18	11-21	12-24	13-27	15-29	16-32	17-35
5	6-9	8-12	9-16	11-19	13-22	14-26	16-29	17-33	19-36	21-39	22-43
6	7-11	9-15	11-19	14-22	16-26	18-30	20-34	22-38	24-42	26-46	28-50
7	9-12	11-17	14-21	16-26	19-30	21-35	24-39	26-44	29-48	31-53	34-57
8	10-14	13-19	16-24	19-29	22-34	25-39	28-44	31-49	34-54	36-60	39-65
9	12-15	15-21	18-27	22-32	25-38	28-44	32-49	35-55	38-61	42-66	45-72
10	13-17	17-23	20-30	24-36	28-42	32-48	36-54	39-61	43-67	47-73	51-79
11	14-19	19-25	23-32	27-39	31-46	35-53	40-59	44-66	48-73	52-80	57-86
12	16-20	20-28	25-35	30-42	34-50	39-57	44-64	48-72	53-79	58-86	63-93
13	17-22	22-30	27-38	32-46	38-53	43-61	48-69	53-77	58-85	63-93	68-101

TABLE DE KRAMER A 15 P. CENT.

TRAITEMENT RÉPÉTITION	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2	2-4	2-6	2-8	2-10	2-12	3-13	3-15	3-17	3-19	3-21	3-23
3	3-6	4-8	4-11	4-14	5-16	5-19	5-22	6-24	6-27	6-30	7-32
4	5-7	5-11	6-14	7-17	7-21	8-24	9-27	9-31	10-34	10-38	11-41
5	6-9	7-13	8-17	9-21	10-25	11-29	12-33	13-37	14-41	15-45	16-49
6	7-11	9-15	10-20	12-24	13-29	14-34	15-39	17-43	18-48	19-53	20-58
7	9-12	10-18	12-23	14-28	16-33	17-39	19-44	21-49	22-55	24-60	25-66
8	10-14	12-20	14-26	17-31	19-37	21-43	23-49	25-55	27-61	29-67	30-74
9	11-16	14-22	17-28	19-35	22-41	24-48	26-55	29-61	31-68	33-75	36-81
10	13-17	16-24	19-31	22-38	24-46	27-53	30-60	33-67	35-75	38-82	41-89
11	14-19	18-26	21-34	24-42	27-50	31-57	34-65	37-73	40-81	43-89	46-97
12	16-20	19-29	23-37	27-45	30-54	34-62	38-70	41-79	45-87	48-96	51-105
13	17-22	21-31	25-40	29-49	33-58	37-67	41-76	45-85	49-94	53-103	57-112

TABLE DE KRAMER A 15 P. CENT, AVEC UN TRAITEMENT PRÉFIXÉ.

TRAITEMENT RÉPÉTITION	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2	2-4	3-5	3-7	4-8	4-10	5-11	5-13	6-14	6-16	7-17	8-18
3	3-5	5-7	5-10	6-12	7-14	8-16	9-18	10-20	11-22	12-24	13-26
4	5-7	6-10	8-12	9-15	10-18	12-20	13-23	15-25	16-28	17-31	19-33
5	6-9	8-12	10-15	12-18	13-22	15-25	17-28	19-31	21-34	23-37	24-41
6	8-10	10-14	12-18	14-22	17-25	19-29	21-33	23-37	26-40	28-44	30-48
7	9-12	12-16	14-21	17-25	20-29	22-34	25-38	28-42	31-46	33-51	36-55
8	11-13	14-18	17-23	20-28	23-33	26-38	29-43	32-48	35-53	39-57	42-62
9	12-15	15-21	19-26	23-31	26-37	30-42	33-48	37-53	40-59	44-64	48-69
10	13-17	17-23	21-29	25-35	29-41	33-47	37-53	41-59	45-65	50-70	54-76
11	15-18	19-25	24-31	28-38	33-44	37-51	42-57	46-64	51-70	55-77	60-83
12	16-20	21-27	26-34	31-41	36-48	41-55	46-62	51-69	56-76	61-83	66-90
13	18-21	23-29	28-38	34-44	39-52	44-60	50-67	55-75	61-82	66-90	72-97

TABLE DE KRAMER A 20 P. CENT.

TRAITEMENT RÉPÉTITION	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2	2-4	2-6	2-8	2-10	3-11	3-13	3-15	3-17	3-19	3-21	3-23
3	3-6	4-8	4-11	5-13	5-16	5-19	6-21	6-24	6-27	7-29	7-32
4	5-7	6-10	6-14	7-17	8-20	8-24	9-27	10-30	10-34	11-37	12-40
5	6-9	7-13	8-17	9-21	11-24	12-28	13-32	14-36	14-41	15-45	16-49
6	7-11	9-15	11-19	12-24	13-29	15-33	16-38	17-43	19-47	20-52	21-57
7	9-12	11-17	13-22	14-28	16-33	18-38	20-43	21-49	23-54	25-59	26-65
8	10-14	13-19	15-25	17-31	19-37	21-43	23-49	25-55	27-61	29-67	31-73
9	12-15	14-22	17-28	20-34	22-41	25-47	27-54	30-60	32-67	34-74	37-80
10	13-17	16-24	19-31	22-38	25-45	28-52	31-59	34-66	36-74	39-81	42-88
11	14-19	18-26	21-34	25-41	28-49	31-57	35-64	38-72	41-80	44-88	47-96
12	16-20	20-28	24-36	27-45	31-53	35-61	39-69	42-78	46-86	49-95	53-103
13	17-22	22-30	26-39	30-48	34-57	38-66	42-75	46-84	50-93	54-102	58-111

TABLE DE KRAMER A 20 P. CENT, AVEC UN TRAITEMENT PRÉFIXÉ.

TRAITEMENT RÉPÉTITION	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2	2-4	3-5	4-6	4-8	5-9	5-11	6-12	7-13	7-15	8-16	9-17
3	4-5	5-7	6-9	7-11	8-13	9-15	10-17	11-19	12-21	13-23	14-25
4	5-7	7-9	8-12	10-14	11-17	13-19	14-22	16-24	17-27	19-29	20-32
5	7-8	8-12	10-15	12-18	14-21	16-24	18-27	20-30	22-33	24-36	26-39
6	8-10	10-14	13-17	15-21	17-25	20-28	22-32	25-35	27-39	29-43	32-46
7	9-12	12-16	15-20	18-24	21-28	23-33	26-37	29-41	32-45	35-49	38-53
8	11-13	14-18	17-23	21-27	24-32	27-37	30-42	34-46	37-51	40-56	44-60
9	12-15	16-20	20-25	23-31	27-36	31-41	35-46	38-52	42-57	46-62	50-67
10	14-16	18-22	22-28	26-34	30-40	35-45	39-51	43-57	47-63	51-69	56-74
11	15-18	20-24	24-31	29-37	34-43	38-50	43-56	48-62	52-69	57-75	62-81
12	17-19	22-26	27-33	32-40	37-47	42-54	47-61	52-68	58-74	63-81	68-88
13	18-21	24-28	29-36	35-43	40-51	46-58	51-66	57-73	63-80	68-88	74-95

Ann. Technol. Agric., 1977, **26** (4), 419-433.

Purification rapide et sous forme non oxydée de la myoglobine des viandes de bovins, ovins et porcins

M. RENERRE

avec la collaboration technique de R. LABAS

Station de Recherches sur la Viande,
Centre de Recherches zootechniques et vétérinaires, I.N.R.A., 63110 Beaumont

Résumé

Ce travail a pour but la mise au point d'une méthode rapide de purification de la myoglobine de bovins, ovins et porcins, qui permet le maintien du fer de l'hème sous forme réduite.

La technique de purification mise en œuvre repose sur l'utilisation de la chromatographie sur CM ou DEAE-cellulose avec élution par variation simultanée de la force ionique et du pH, et d'une chromatographie sur Sephadex G 50.

Le pigment purifié ainsi obtenu présente un coefficient de pureté supérieur à 3 (Absorbance à 410 nm /Absorbance à 280 nm). Son analyse par électrophorèse et isoélectrofocalisation met en évidence plusieurs zones de migrations qui correspondent à la microhétérogénéité du pigment. Le dosage du fer des myoglobines purifiées des muscles de bovins, ovins et porcins, indique une teneur moyenne de 0,334 p. 100 ce qui correspond à un poids moléculaire du pigment voisin de 17 000. Après purification, le pourcentage de la forme oxygénée du pigment est voisin à 90 p. 100.

Mots clés : *viandes, myoglobine non oxydée, purification.*

Introduction

Si en 1921, GUNTHER propose le nom de myoglobine au pigment héminique musculaire, ce n'est qu'en 1932 que THÉORELL purifie cette protéine par précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium. De nombreux auteurs utilisent ensuite cette technique en y introduisant quelques variantes comme MORGAN en 1935 qui substitue à la précipitation par le sulfate d'ammonium, la précipitation par des concentrations croissantes de phosphate mono- et bi-potassique. Tous ces travaux portaient sur le pigment du muscle cardiaque de cheval. Ils conduisaient à l'obtention de myoglobine sous forme cristallisée permettant l'étude de la structure de cette protéine par diffraction aux rayons X.

Appliquée aux muscles squelettiques, cette technique est moins efficace, c'est la raison pour laquelle de nombreux auteurs cherchèrent à l'améliorer (ROCHE, 1942; KEILIN et SCHMIDT, 1948; ROSSI-FANELLI, 1949; KENDREW *et al.*, 1956). Ils obtinrent la myoglobine cristallisée sous forme oxydée (metmyoglobine) dont la réduction est souvent difficile, ce qui est un obstacle à l'étude de certaines propriétés biologiques de cette protéine comme en particulier l'étude de son mécanisme d'oxydation.

Par la suite, apparurent les premières tentatives de purification par chromatographie d'échange d'ions (RUMEN, 1959; AKESON et THÉORELL, 1960; BROWN, 1961; QUINN et PEARSON, 1964) associée ou non à une filtration sur gel. Comme dans le cas précédent, ces purifications conduisent le plus souvent à l'obtention de la forme oxydée.

La présente publication rapporte les résultats de l'étude que nous avons entreprise sur muscles de bovins, ovins et porcins pour mettre au point une méthode rapide de purification de la myoglobine qui permette le maintien du fer de l'hème sous forme réduite. Nous disposerons ainsi d'un substrat qui nous permettra d'explorer les différents problèmes qui se posent aux technologues tels que le mécanisme d'oxydation du pigment de la viande en cours de conservation et le mécanisme de la nitrosation dans les produits saumurés.

I. — Matériel

L'étude a porté sur des taurillons et des génisses de diverses races d'un âge compris entre 1 et 3 ans, sur des agneaux âgés de 6 mois de race Limousine et sur des porcs âgés de 6 mois issus d'un croisement Large White × Landrace. Les animaux ont été abattus au C.R.Z.V.

Les déterminations ont porté sur les muscles *Rectus abdominis* pour les bovins, *Semi membranosus* pour les agneaux et *Semi tendinosus* pour les porcs. Les échantillons musculaires étaient prélevés sur la carcasse chaude et conservés à + 4 °C.

II. — Méthodes

Extraction du pigment

A partir de 200 g de muscles, l'extraction est faite 2 h *post mortem* pour le bœuf et l'agneau et 1 h *post mortem* pour le porc. Le muscle débarrassé auparavant de sa graisse et de son tissu conjonctif externe, est broyé pendant 20 secondes au broyeur Moulinex puis homogénéisé pendant 30 secondes à l'Ultra Turrax dans 2 volumes d'eau distillée (YAMAZAKI, 1964; HARDMANN *et al.*, 1966). Le pH est maintenu à une valeur supérieure à 6,0. Toutes ces opérations sont réalisées à une température voisine de 0, + 4 °C. Une extraction d'une heure suivie d'une centrifugation à 5 000 g pendant 20 min puis d'une filtration sur papier filtre permet d'enlever les lipides non sédimentés. On procède ensuite à deux dialyses successives : une contre de l'eau pendant une heure et une contre le tampon de chromatographie : tampon phosphate de sodium 0,01 M, pH 6,2 pour la viande

de bœuf et pour la viande d'agneau, et tampon tris HCl pH 8,6 0,01 M pour la viande de porc. Cette dialyse dure une quinzaine d'heures et permet de précipiter certaines protéines contaminantes qui sont enlevées par une centrifugation à 5 000 g pendant 10 min suivie d'une filtration du surnageant.

Mesures spectrophotométriques

Les spectres d'absorption des solutions de myoglobine sont enregistrés à l'aide d'un spectrophotomètre Beckman Acta III entre 400 et 700 nm.

Caractéristiques de la fraction purifiée

Les coefficients de pureté des différentes fractions isolées sont obtenus par détermination du rapport Absorbance à 410 nm/Absorbance à 280 nm (l'Absorbance à 410 nm ou bande de Soret correspond au maximum d'absorption des protéines héminiques), les lectures sont réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre Beckman DU.

L'analyse électrophorétique des protéines en solution est effectuée à température ambiante sur gel de polyacrylamide à 5 p. 100 avec un tampon circulant de borate de sodium 0,3 M pH 7,6. La durée de l'électrophorèse est de 2 heures dans un champ électrique de 2 V/cm. Les protéines sont colorées par le bleu de Coomasie et la myoglobine est mise en évidence par sa réaction peroxydasique donnant une coloration brune avec la benzidine. L'analyse des bandes est réalisée par densitométrie à la longueur d'onde de 595 nm à l'aide d'un lecteur de gel Chromoscan.

L'isoélectrofocalisation est réalisée sur plaque de gel (245 mm × 110 mm × 1 mm) à 5 p. 100 d'acrylamide, 0,15 p. 100 N-N′ méthylènebisacrylamide, 6 p. 100 d'ampholytes. La polymérisation du gel se fait en 2 heures sous irradiation ultra-violette. La gamme de pH varie de 3,5 à 9,5. Les gels sont chargés à l'aide de rectangles de papier Whatmann (3 MM) sur lesquels on dépose 15 µl de solution de protéines dont la concentration est comprise entre 1 et 2 mg/ml. Le gel est maintenu à une température basse à l'aide d'une circulation d'eau froide sous la plaque de migration. L'électrofocalisation, sous ampérage constant (50 mA) est réalisée par augmentation de la tension qui passe de 220 V à 1 200 V en une heure et demie. Les points isoélectriques sont mesurés à l'aide d'une électrode combinée de contact à extrémité plate (Ingold n° 403-30 M8) à la température de la focalisation. La méthode de coloration des protéines utilisée est celle décrite par VESTERBERG (1972). La myoglobine est mise en évidence par sa réaction peroxydasique avec la benzidine. Les bandes sont lues par densitométrie à l'aide d'un lecteur de plaque Chromoscan.

Le dosage des protéines est réalisé à l'aide de la méthode du Biuret et de la méthode de Folin.

Le dosage du fer du noyau héminique est réalisé selon deux méthodes :

— à l'aide de la réaction à l'Ortho-phénantroline décrite par CAMERON (1965),

— au moyen d'une méthode physique reposant sur la spectrophotométrie d'absorption atomique en flamme air-acétylène à l'aide d'un appareil Perkin-Elmer n° 303.

III. — Résultats et discussion

1. *Isolement et caractérisation de la myoglobine de muscles de bovins*

Depuis les premiers travaux de AKESON et THÉORELL (1960), la purification de la myoglobine passe par l'emploi de celluloses échangeuses d'ions avec élution, dans la majorité des cas, par un gradient de pH. Nous avons mis en œuvre cette technique en réalisant une chromatographie des protéines sarcoplasmiques totales sur une colonne de carboxyméthylcellulose (CM 32 Whatman) équilibrée dans du tampon phosphate de sodium 0,01 M pH 6,2. L'élution a été réalisée par un

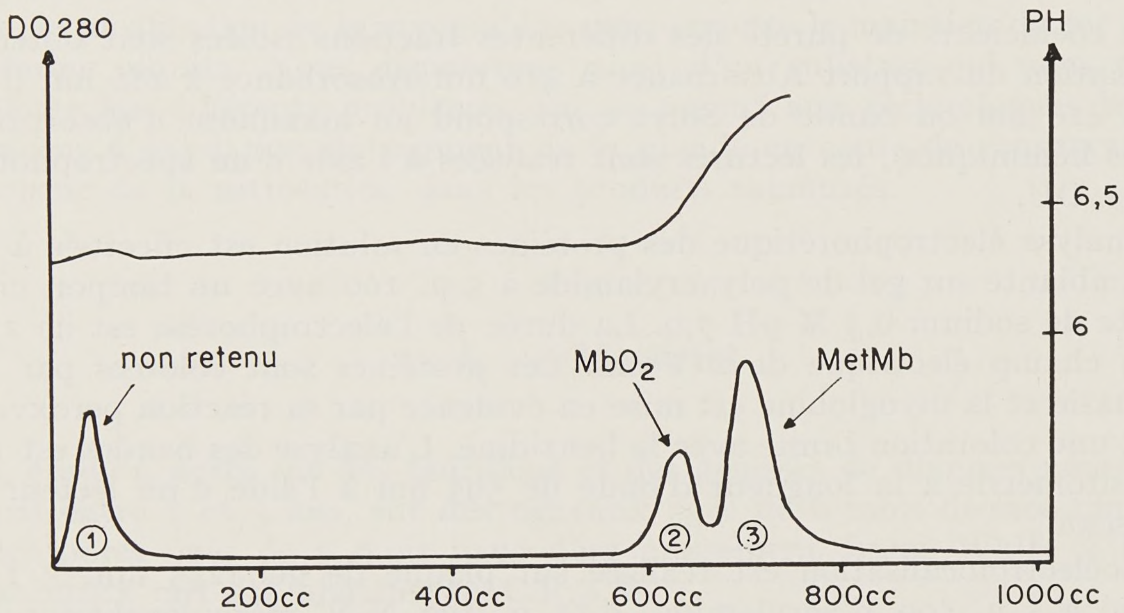


FIG. 1. — *Chromatographie sur colonne de CM-cellulose des protéines sarcoplasmiques de bœuf à l'aide d'un gradient de pH obtenu par addition croissante de phosphate disodique 0,04 M dans du tampon de phosphate de sodium 0,01 M pH 6,2, à température ambiante.*
Dimension de la colonne : ∅ 50 mm × H 40 mm
Quantité d'échantillon : 500 mg
Débit de la colonne : 350 ml/h
Rendement de la colonne : 64 p. cent
———— absorbance à 280 nm
———— gradient de pH

gradient de pH (FELLAND et SNYDER, 1968). Le fractionnement obtenu est rapporté dans la figure 1. On constate l'existence de 3 fractions différentes :

— une fraction incolore non retenue (n° 1) qui représente 40 p. 100 des protéines totales alors que dans les conditions décrites par FELLAND et SNYDER (1968) elles ne représentaient que 24 p. 100 du total. L'importance relative de cette fraction semblerait dépendre des caractéristiques géométriques de la colonne,

— deux fractions colorées en rouge vif et en marron correspondant à de la myoglobine oxygénée (n° 2) et à de la myoglobine oxydée (n° 3) qui représentent 60 p. 100 des protéines éluées. La fraction principale (44 p. 100) est constituée de myoglobine oxydée que nous ne sommes pas parvenus à réduire. L'oxydation du pigment sur la colonne se produit lorsque l'on enregistre la variation rapide du pH de l'éluat. Cette évolution anormale du pH avait déjà été mise en évidence par FELLAND et SNYDER (1968) et SATTERLEE *et al.* (1969).

Cette méthode ne nous donne pas satisfaction car d'une part, une grande partie de la myoglobine ainsi obtenue est transformée en forme oxydée et d'autre part, l'analyse électrophorétique sur gel de polyacrylamide montre que les fractions de myoglobine obtenues ne sont pas pures, la myoglobine ne représentant qu'environ 50 p. 100 des protéines totales (fig. 3).

Compte tenu de ces résultats, nous avons abandonné l'élution par un gradient de pH : La protéine est éluée à température ambiante par augmentation brutale du pH et de la force ionique. Une quantité de l'ordre de 1 800 mg de protéines

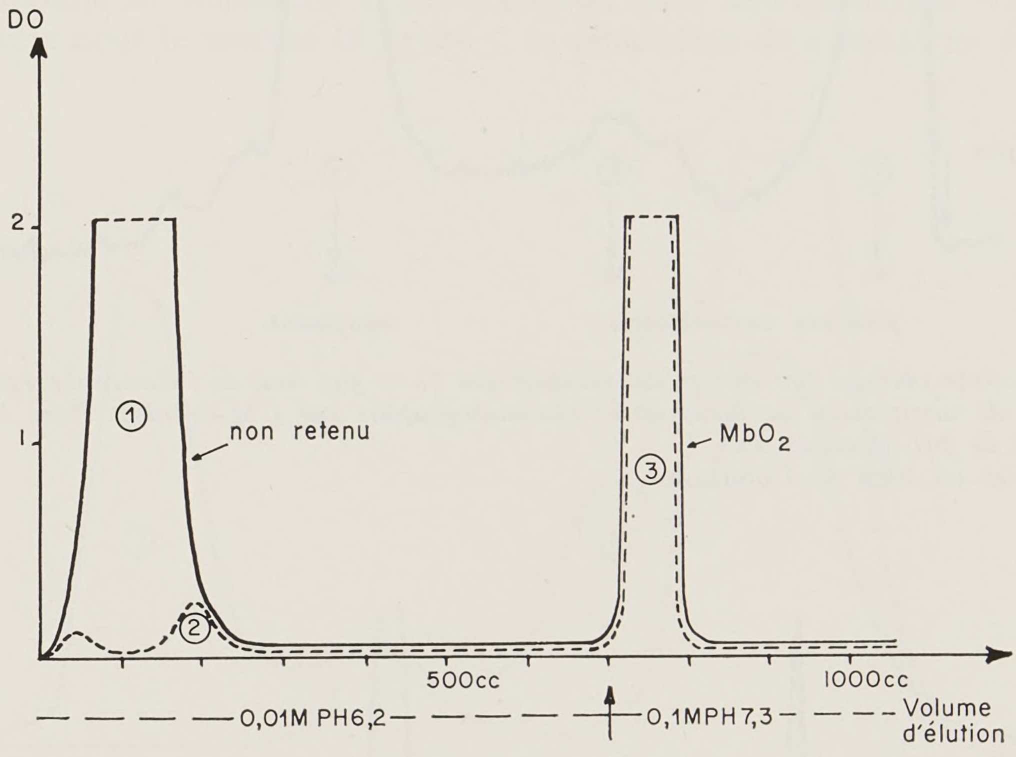


FIG. 2. — *Chromatographie sur colonne de CM-cellulose des protéines sarcoplasmiques de bœuf par augmentation simultanée du pH et de la force ionique, à température ambiante.*
Dimensions de la colonne : ∅ 50 mm × H 40 mm
Quantité d'échantillon : 1 800 mg
Débit de la colonne : 350 ml/h
Rendement de la colonne : 92 p. 100

———————— absorbance à 280 nm
- - - - - - - - - - - absorbance à 410 nm

sarcoplasmiques est déposée sur la colonne; l'effluent étant collecté à une vitesse de 350 ml/h. Le passage d'un volume de 700 cm³ de tampon phosphate de sodium 0,01 M pH 6,2 permet l'élution de protéines incolores (fraction 1) décelables par leur réaction de précipitation en présence d'acide trichloracétique (5 p. 100), ainsi que l'élution de protéines formant un anneau marron sur la colonne (fraction 2). La myoglobine est ensuite éluée après passage d'environ 200 cm³ de tampon phosphate de sodium 0,1 M pH 7,3 (fraction 3). Le fractionnement obtenu est rapporté dans la figure 2. Dans ces conditions le spectre d'absorption de la myoglobine purifiée montre que le pourcentage de la forme oxygénée est de l'ordre de 90 p. 100.

A la surface de la colonne une bande de couleur jaunâtre restre fixée. Ces protéines contiennent un groupement héminique du fait de leur absorption à 410 nm. Selon AKESON et THÉORELL (1960), QUINN et PEARSON (1964), VAN DEN

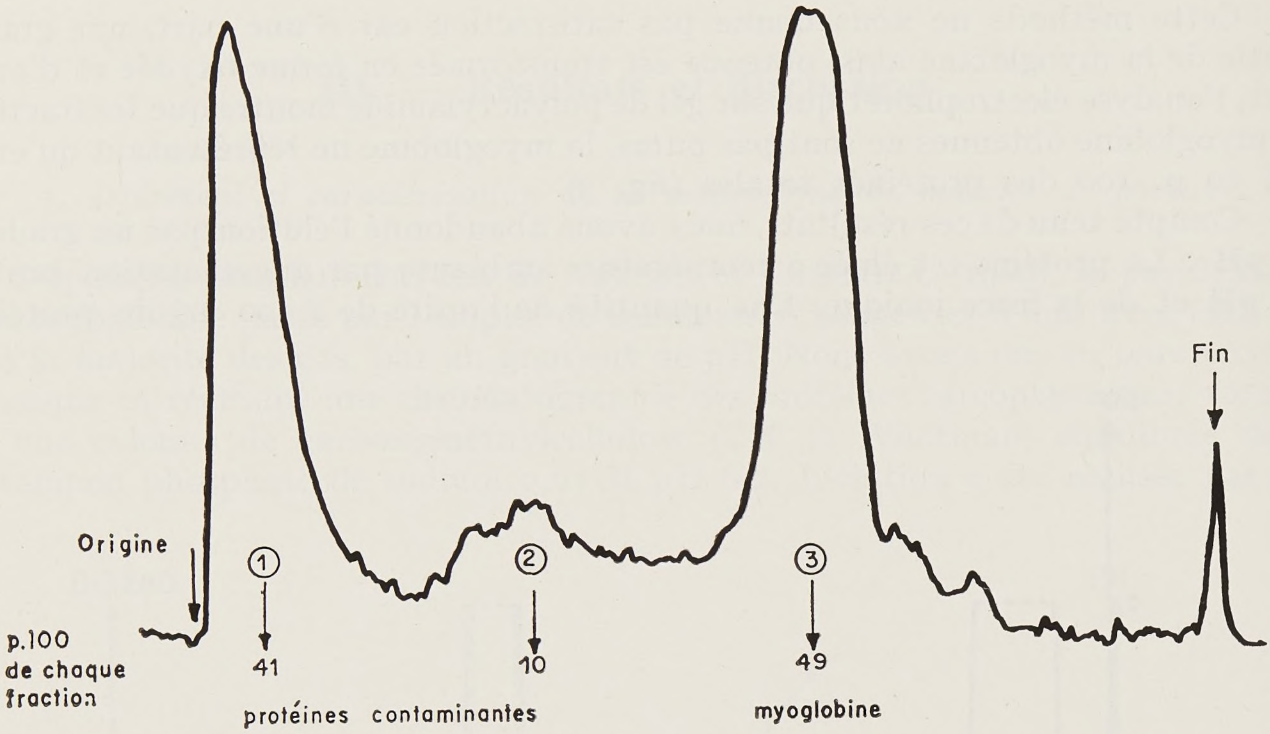


FIG. 3. — *Courbe obtenue par lecture densitométrique* ($\lambda = 595$ *nm*) *de l'électrophorégramme d'une solution de myoglobine de bœuf après chromatographie sur CM-cellulose éluée à l'aide d'un gradient de pH* (*fraction 2*).
Coloration au bleu de Coomasie.

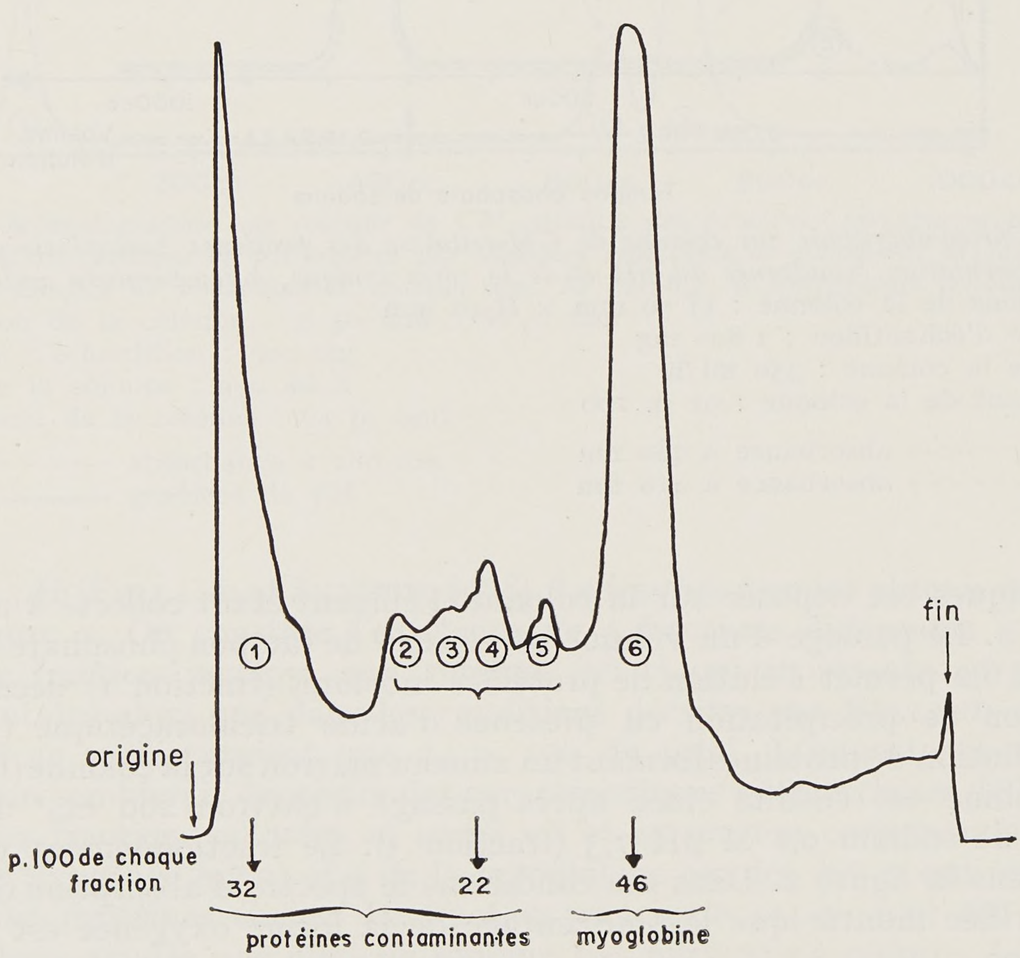


FIG. 4. — *Courbe obtenue par lecture densitométrique* ($\lambda = 595$ *nm*) *de l'électrophorégramme d'une solution de myoglobine de bœuf après chromatographie sur CM-cellulose éluée par du tampon phosphate de sodium 0,1 M pH 7,3* (*fraction 3*).
Coloration au bleu de Coomasie.

Oord *et al.* (1969), cette fraction correspondrait à l'hémoglobine résiduelle et aux cytochromes. La quantité de myoglobine recueillie après chromatographie sur colonne de CM-cellulose représente 51 p. 100 des protéines sarcoplasmiques éluées. L'analyse électrophorétique sur gel de polyacrylamide (fig. 4) montre que la fraction isolée n'est pas pure et que son degré de contamination est pratiquement équivalent à celui de la fraction isolée après élution de la colonne de CM-cellulose à l'aide d'un gradient de pH.

La solution de myoglobine purifiée sur CM-cellulose est ensuite dialysée pendant 15 heures contre du tampon phosphate de sodium 0,1 M pH 7,3 puis filtrée sur colonne de Sephadex G 50. L'élution dure une quinzaine d'heures et permet, comme nous le montre la figure 5, la séparation de 4 fractions distinctes.

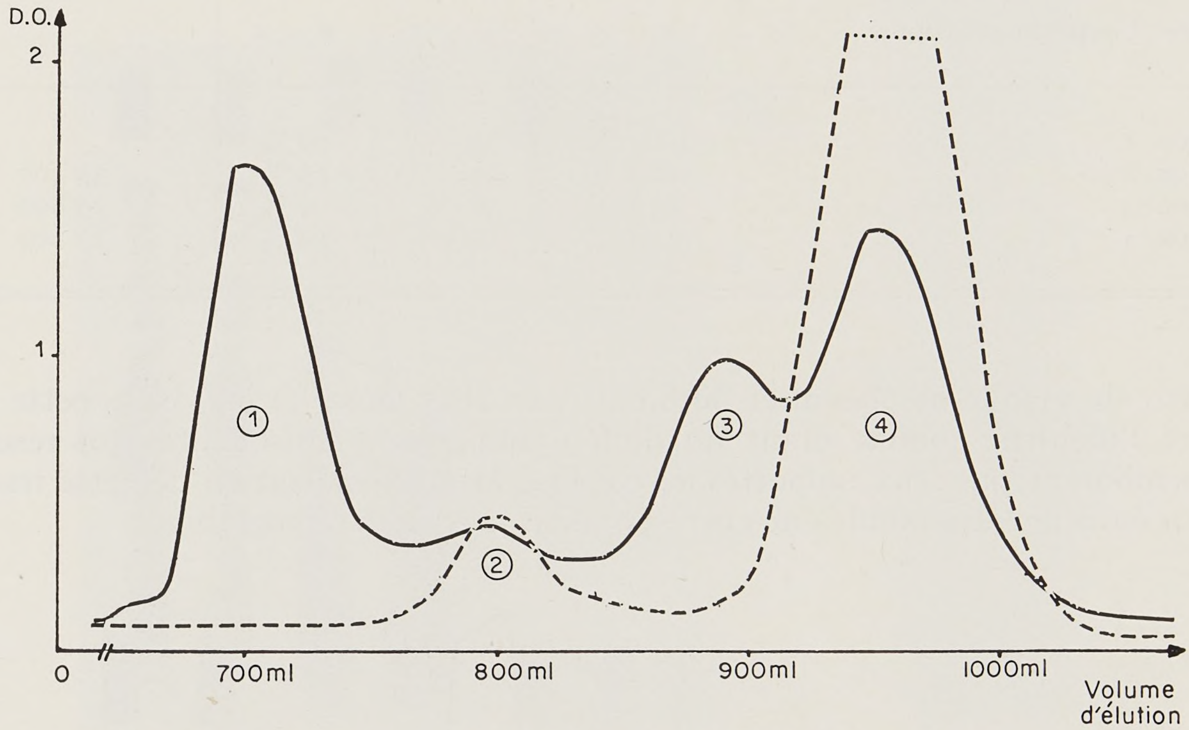


Fig. 5. — *Chromatographie de protéines sarcoplasmiques de bœuf sur colonne de Sephadex G 50 éluée par du tampon phosphate de sodium 0,1 M pH 7,3, protéines purifiées auparavant par passage sur colonne de CM-cellulose éluée par augmentation simultanée du pH et de la force ionique (fraction 3).*
Dimensions de la colonne : ∅ 50 mm × H 1 000 mm
Quantité d'échantillon : 300 mg
Débit de la colonne : 50 ml/h
——————— Absorbance à 280 nm
- - - - - - - - - - - Absorbance à 410 nm

L'étalonnage de la colonne à l'aide de protéines de poids moléculaires connus (Cytochrome C : 13 000, myoglobine de cheval : 17 000, albumine de jaune d'œuf 45 000) et le dosage des protéines de chaque fraction permet de dresser un bilan d'élution (tabl. 1).

La fraction 1 correspond à des protéines non héminiques de poids moléculaire élevé.

La fraction 2 correspond à une protéine héminique de poids moléculaire de l'ordre de 35 000 qui pourrait correspondre soit à de l'hémoglobine dissociée en 2 sous unités soit à un dimère de la myoglobine. A partir de myoglobine de cachalot, Hardmann *et al.* (1966) qui obtiennent un chromatogramme d'élution comparable au nôtre pensent que ce pic correspond à un agrégat de myoglobine.

TABLEAU I

Bilan d'élution de la chromatographie de protéines sarcoplasmiques de bœuf, de porc et d'agneau sur colonne de Sephadex G50 éluée par du tampon phosphate de sodium 0,1 M pH 7,3, protéines purifiées auparavant par passage sur colonne de CM-cellulose éluée par augmentation simultanée du pH et de la force ionique (fraction 3).

Espèces	Bœuf	Porc	Agneau	Poids moléculaire estimé de chaque fraction (bœuf)
Rendement de la colonne	88 % ± 9 %	93 %	89 %	
Nombre d'expérimentations	$n = 6$	$n = 2$	$n = 2$	
Fraction 1	47 %	77 %	69 %	—
Fraction 2	12,5 %	10 %	15 %	35 400
Fraction 3	13,2 %	0 %	4 %	25 800
Fraction 4	27,2 %	12,5 %	12 %	17 200

A partir de viande de cheval et de bœuf, VAN DEN OORD (1969) isole cette fraction et l'identifie comme étant un dimère du pigment musculaire. Nos résultats ne corroborent pas ceux rapportés ici car l'iso-électrofocalisation de cette fraction met en évidence des bandes ne correspondant pas à la myoglobine.

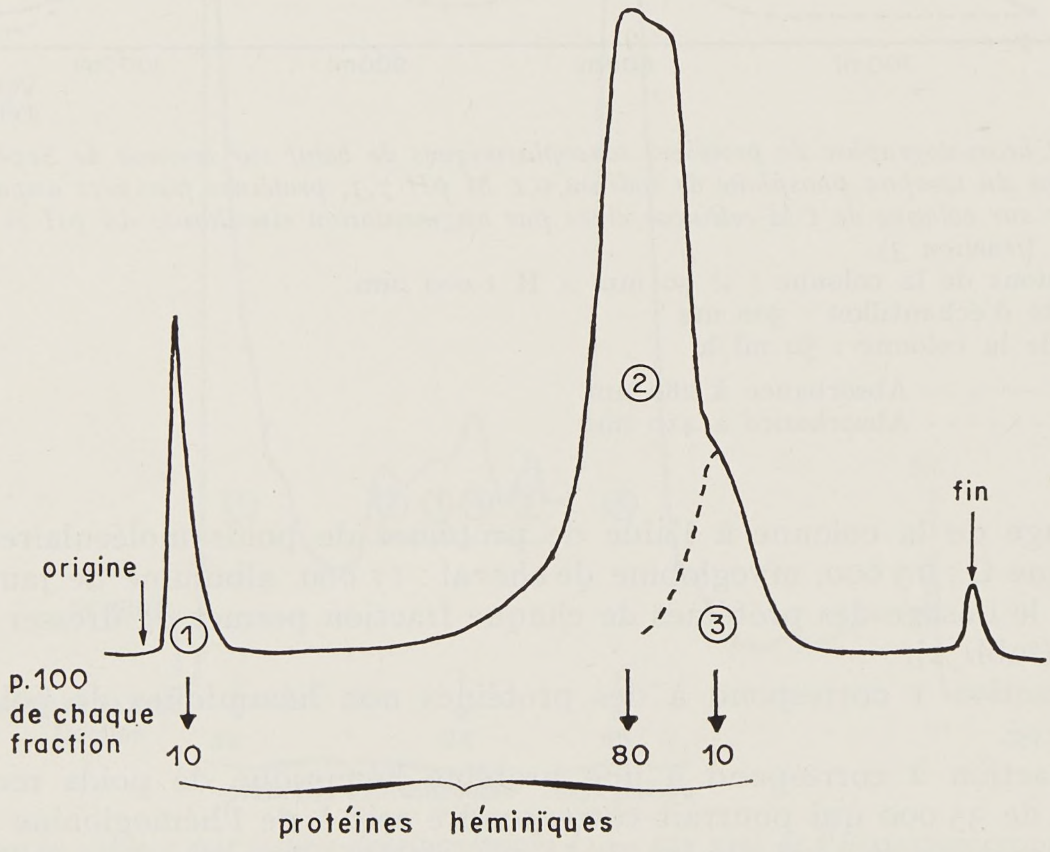


FIG. 6. — *Courbe obtenue par lecture densitométrique ($\lambda = 595$ nm) de l'électrophorégramme d'une solution de myoglobine après chromatographie sur colonne de Sephadex G 50 (fraction 4).* Coloration au bleu de Coomasie et à la benzidine.

La fraction 3 renferme des protéines non héminiques, de poids moléculaire de l'ordre de 25 000.

La fraction 4 de poids moléculaire de l'ordre de 17 000 correspond à la myoglobine. Les analyses biochimiques du pigment ont été réalisées sur la fraction correspondant au sommet de ce pic. L'analyse électrophorétique sur gel, comme l'indique la figure 6, permet la mise en évidence de 3 bandes, une bande principale et deux bandes moins intenses représentant chacune respectivement 80 p. 100, 10 p. 100 et 10 p. 100 des protéines totales. Ces 3 bandes réagissent à la coloration à la benzidine indiquant qu'elles correspondent à des protéines héminiques et

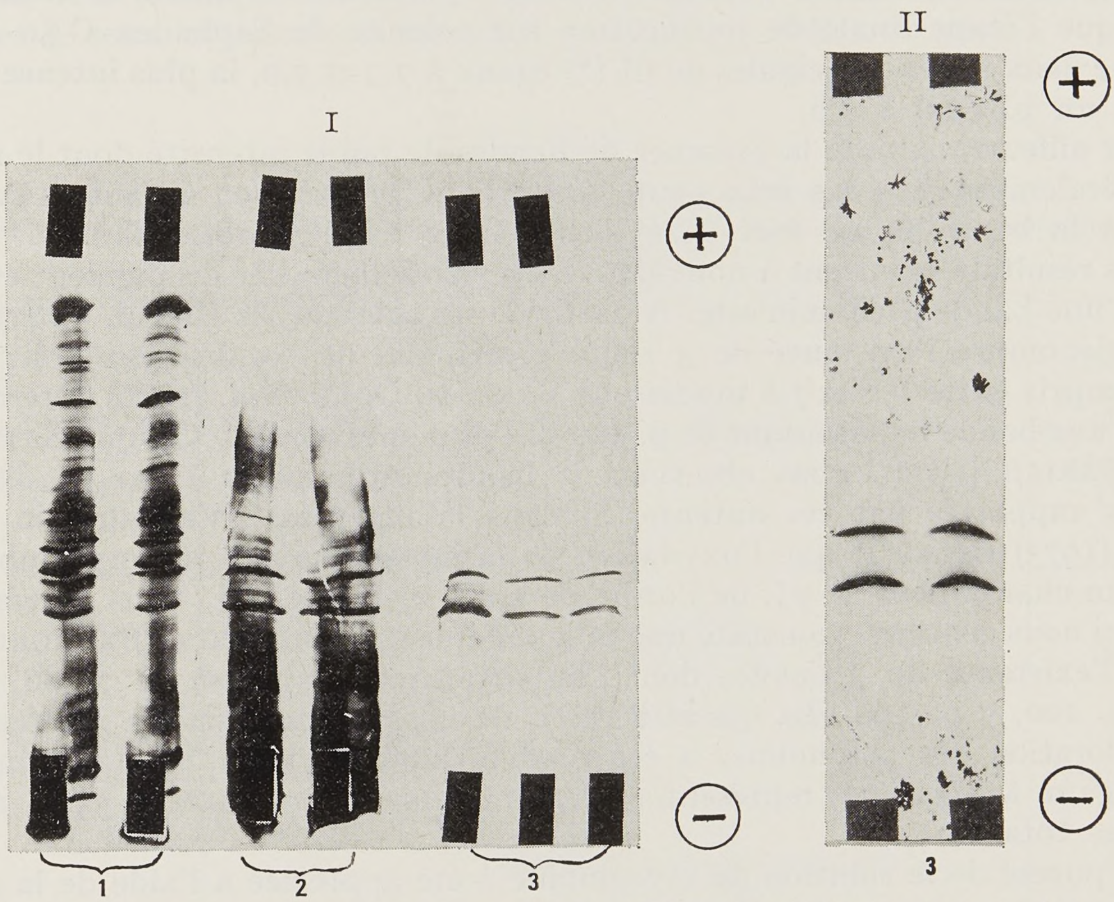


FIG. 7. — *Plaques d'isoélectrofocalisation de myoglobine de bœuf après différents stades de purification.*
Coloration au bleu de Coomasie I et à la benzidine II
1 avant purification
2 après purification sur CM-cellulose éluée par variation simultanée du pH et de la force ionique (fraction 3)
3 après purifications sur CM-cellulose + Sephadex G 50

illustrent le phénomène qu'il est convenu d'appeler la « microhétérogénéité » de la myoglobine mise en évidence par BERNARD *et al.* (1961) chez le cheval, le bœuf, le porc et le mouton ainsi que par QUINN et PEARSON (1968), SATTERLEE *et al.* (1969), PAN et SOLBERG (1972) chez le bœuf.

Cette microhétérogénéité n'est pas due à un artefact lors de la purification du pigment car malgré la diversité des méthodes utilisées, les observations sont identiques. Rappelons aussi que lors de l'analyse électrophorétique, de nombreux auteurs signalent l'existence d'une bande prédominante dont l'importance relative est variable. Depuis les travaux de THÉORELL (1955) plusieurs hypothèses ont été émises pour tenter d'expliquer cette microhétérogénéité : composition et/ou séquence en amino-acides différente, variations du contenu en amides (résidus glutaminyle et/ou asparaginyle) changements de conformation, état d'oxydation variable de l'atome de fer, possibilité de l'existence de myoglobine fœtale....

Il est à noter que d'autres protéines apparaissent sous forme hétérogène comme le Cytochrome C ou la Lactoperoxydase (QUINN, 1973).

Dans le but de confirmer ces premières observations nous avons décidé d'utiliser la technique d'isoélectrofocalisation sur plaque de gel (VESTERBERG, 1972).

La figure 7 présente les principaux résultats obtenus après les différents stades de purification du pigment. L'isoélectrofocalisation des protéines sarcoplasmiques avant toute purification permet de détecter un grand nombre de bandes, de l'ordre de 25 environ, plus ou moins intenses, et dont la plupart sont focalisées dans une zone de pH compris entre 3,5 et 9,5. La purification sur colonne de CM-cellulose conduit à l'obtention d'une quinzaine de zones de focalisation tandis que l'étape finale de purification sur colonne de Sephadex G 50 met en évidence deux zones principales de pI (*) égaux à 7,3 et 7,6, la plus intense correspond à un pI égal à 7,6.

Par ailleurs, on note la présence de bandes de faible intensité dont le nombre est généralement de 3 à 5 mais peut varier d'une préparation à l'autre. Par coloration à la benzidine on met en évidence les 2 bandes principales.

Ces résultats montrent à nouveau, la microhétérogénéité du pigment et l'existence d'une bande prédominante. A partir de myoglobine de cheval, VESTERBERG (1967) dénombre l'existence de 3 zones principales de focalisation dont les pI sont compris entre 6,8 et 7,8 tandis que VAN DEN OORD *et al.* (1969) notent l'existence d'une bande représentant 86 p. 100 des protéines totales. Comme SATTERLEE et ZACHARIAH (1972), nous observons 2 bandes principales à des pI différents de ceux rapportés par ces auteurs. Si dans la littérature VESTERBERG (1967), QUINN (1973) signalent que l'oxydation de la myoglobine en metmyoglobine entraîne un changement de pI, de l'ordre de 0,2 à 0,5 unité pH, nous n'avons pas, en ce qui nous concerne, constaté une telle différence. ANTONINI et BRUNORI (1971) notent l'existence de 3 bandes dont l'importance relative est de 70-80 p. 100, 15-25 p. 100, 5 p. 100. La quantification de nos résultats vu les artefacts dus à la coloration des ampholines a été rendue difficile : les 2 bandes principales de pI égaux à 7,6 et 7,3 représentent respectivement 52 p. 100 et 33 p. 100 des protéines totales.

La pureté de la solution de myoglobine a été appréciée à l'aide de la mesure Absorbance à 410 nm/Abondance à 280 nm dont la valeur est fonction de la quantité de protéines héminiques par rapport aux protéines totales (tabl. 2).

TABLEAU 2

Évolution du rapport de pureté des myoglobines de bœuf, de porc et d'agneau après différents stades de purification

Rapport de pureté : Absorbance à 410 nm / Absorbance à 280 nm	Après passage sur CM-cellulose ou DEAE-cellulose	Après passage sur Sephadex G 50	Nombre d'expérimentations
Bœuf	1,18 ± 0,52	3,21 ± 0,37	$n = 5$
Porc	0,75	3,15	$n = 2$
Agneau	1,34	3,48	$n = 2$

(*) *p*I : point isoélectrique.

Dans la littérature, les coefficients de pureté sont voisins du nôtre, : YAMAZAKI *et al.* (1964) à partir de myoglobine de cœur de cheval notent une valeur de 3,2 tandis que HARDMANN *et al.* (1966) trouvent un coefficient de 3,5 à partir de myoglobine de cachalot.

Par dosage du fer et de la quantité de protéines correspondantes on peut évaluer le degré de pureté de la myoglobine ainsi obtenue qui est de l'ordre de 100 p. 100. Connaissant le pourcentage de fer présent dans la myoglobine que nous trouvons égal à 0,332 p. 100 ainsi que la masse atomique du fer, nous pouvons en déduire le poids moléculaire de la myoglobine : 16 870 (tabl. 3). Le dosage du fer, par voie chimique est plus délicat mais il nous fournit des résultats très semblables à ceux obtenus par absorption atomique (PM : 17 500).

TABLEAU 3

Pourcentage de fer dans les myoglobines de bœuf, de porc et d'agneau après chromatographie sur CM ou DEAE-cellulose et Sephadex G 50, et estimation de leur degré de pureté

Espèces	Dosage du fer par absorption atomique (%)	Poids moléculaire correspondant	Poids moléculaire réel	Degré de pureté de la myoglobine (%)
Bœuf. . .	0,332	16 870	17 693 (ATASSI et al., 1970)	95
			17 550 (HAN et al., 1970)	96
Porc. . .	0,336	16 666	17 142 (SATTERLEE-ZACHARIAH, 1972)	97
			17 200 (NAKANISHI-IZUMIMOTO, 1972)	97
Agneau. .	0,335	16 700	17 365 (HAN et al., 1972)	96
			17 735 (ATASSI et al., 1970)	94

2. *Isolement et caractérisation du pigment purifié de muscles d'ovins et de porcins*

Les travaux de BERNARD *et al.* en 1961 ont montré que la myoglobine de porc migrait plus vers l'anode que la myoglobine de bœuf ou de mouton. Ces observations ont été confirmées ultérieurement en particulier par SATTERLEE et ZACHARIAH (1972) qui indiquent que les myoglobines de bœuf et de mouton ont un comportement en isoélectrofocalisation assez semblable.

Compte tenu de ces caractéristiques particulières, la purification de la myoglobine d'agneau se fait selon le même schéma que celle du bœuf à savoir une

première purification sur carboxyméthylcellulose, l'élution de la myoglobine se faisant à l'aide d'un tampon phosphate de sodium 0,1 M pH 7,3. La purification de la myoglobine de porc nécessite le recours à une première chromatographie sur DEAE-cellulose (DE 32 Whatmann, ∅ 50 mm × H 40 mm) équilibrée dans du tampon tris HCl pH 8,6 0,01 M qui permet le lavage de protéines formant

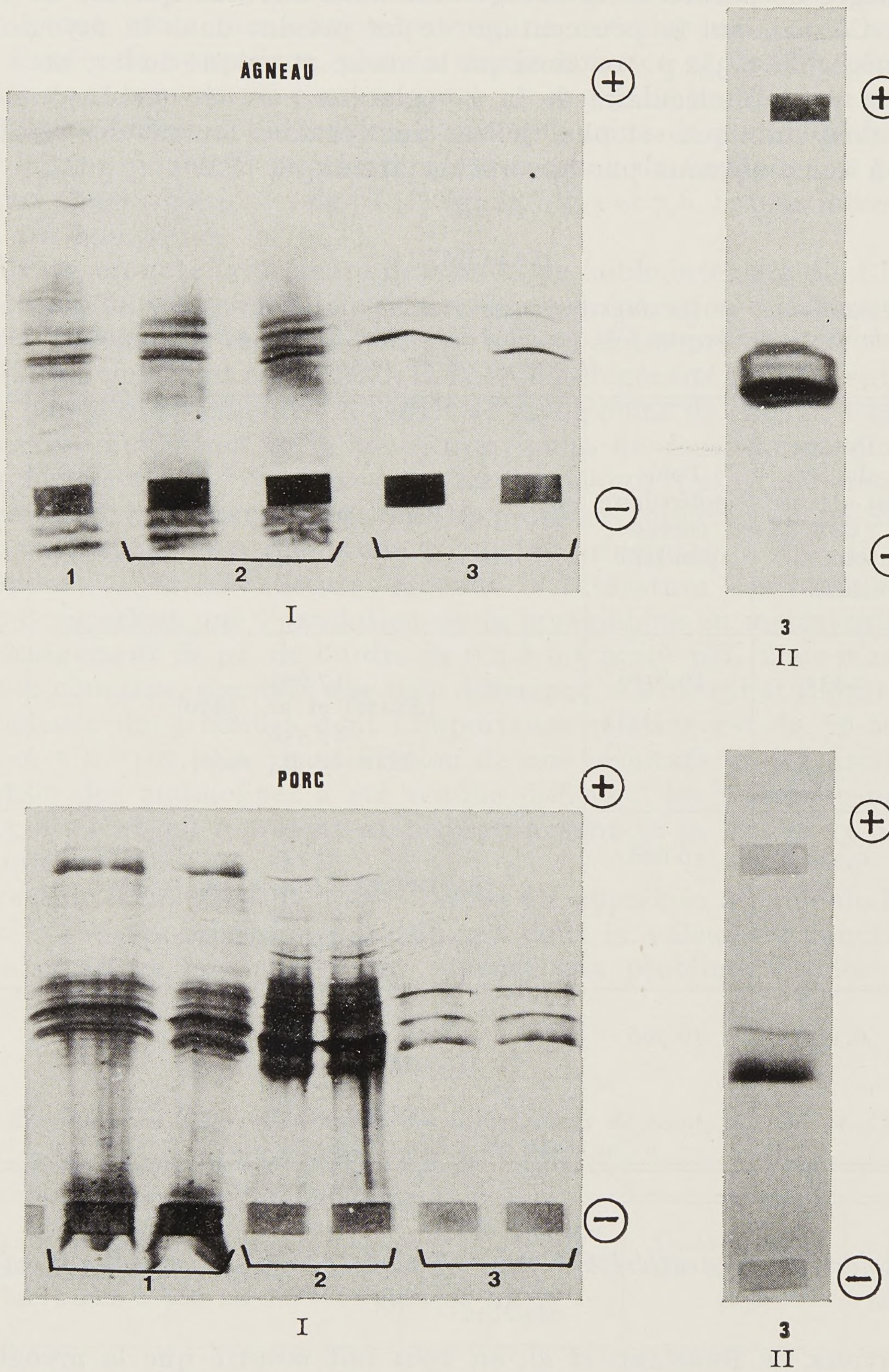


FIG. 8. — *Plaques d'isoélectrofocalisation de myoglobines de porc et d'agneau après différents stades de purification.*
Coloration au bleu de Coomasie I et à la benzidine II
1 avant purification
2 après purification sur CM ou DEAE-cellulose éluée par variation simultanée du pH et de la force ionique
3 après purifications sur CM ou DEAE-cellulose + Sephadex G 50

un anneau de couleur marron sur la colonne. L'élution du pigment est réalisée à l'aide d'un volume de 400 cm³ de tampon tris HCl pH 7,0 0,05 M à une température de + 4°C. La quantité de myoglobine recueillie par rapport aux protéines sarcoplasmiques éluées représente 36 p. 100 pour le muscle d'agneau et 32 p. 100 pour le muscle de porc.

L'amélioration de la purification par passage sur tamis moléculaire de Sephadex G 50 se fait dans des conditions analogues aux conditions précédemment décrites. Le bilan de récupération de la chromatographie ainsi que le dosage des protéines de chaque fraction sont consignés dans le tableau 1. Les résultats obtenus à partir des muscles d'ovins et de porcins sont sensiblement identiques mais diffèrent de ceux observés à partir des muscles de bovins : le pic 3 a pratiquement disparu et le pourcentage de myoglobine purifiée par rapport aux autres protéines sarcoplasmiques n'est plus que de 12 p. 100.

L'analyse du pigment musculaire purifié permet de mettre en évidence des différences entre les 2 espèces étudiées. L'isoélectrofocalisation sur gel de polyacrylamide montre que la myoglobine de porc a un comportement anodique par rapport à la myoglobine d'agneau comme le montre la figure 8. La myoglobine d'agneau présente 2 zones d'électrofocalisation principales de pI égaux à 7,5 et 7,7, la zone de pI égale à 7,7 étant la plus intense, plus 3 bandes faiblement colorées. La myoglobine de porc est caractérisée par 3 bandes principales de pI égaux à 6,3, 6,6, 6,8, la bande de pI égal à 6,8 étant la plus intense. Pour les 2 espèces étudiées toutes les fractions ont été mises en évidence, à la fois, après coloration à la benzidine et au bleu de Coomasie.

Ces résultats sont en bon accord avec ceux de la littérature. Les propriétés particulières de la myoglobine de porc pourraient être dues à une composition en amino-acides différente de celle de bœuf et d'agneau comme l'ont montré ATASSI *et al.* en 1970. Si les myoglobines de bœuf et d'agneau ont des compositions en amino-acides identiques à l'exception de l'alanine et de la leucine, BERNARD *et al.* (1961) ainsi que HAN *et al.* (1970-71) constatent que les peptides obtenus après hydrolyse enzymatique n'ont pas de séquences en amino-acides identiques ce qui pourrait avoir des conséquences au niveau de l'isoélectrofocalisation.

La pureté des solutions de myoglobine des 2 espèces a été vérifiée par mesure du rapport Absorbance à 410 nm/Absorbance à 280 nm. Les résultats consignés dans le tableau 2 montrent que les myoglobines sont obtenues à des degrés de pureté comparable. Le dosage des protéines correspondant à la fraction purifiée après Sephadex G 50 ainsi que le dosage du fer permettent de définir un degré de pureté des myoglobines de porc et d'agneau proche de 100 p. 100. A partir de la quantité de fer présente dans la molécule nous pouvons calculer le poids moléculaire des myoglobines (tabl. 3).

Conclusion

Cette méthode simple de purification présente l'avantage de permettre l'obtention de la myoglobine purifiée en grande majorité sous forme non oxydée et d'être applicable à plusieurs espèces intéressantes du point de vue de la boucherie.

L'obtention de myoglobine native doit permettre de poursuivre des études plus approfondies de la caractérisation du pigment, en particulier il est important de préciser la relation qui peut exister entre la vitesse d'autoxydation du pigment

et la vitesse de brunissement de la viande. Il serait intéressant de savoir si ce paramètre peut expliquer la variabilité de stabilité de couleur observée entre espèces et voire entre muscles d'un même animal.

Dans un deuxième temps, l'obtention du pigment purifié permettra d'entreprendre l'étude du comportement du pigment en fonction de l'environnement biochimique existant dans le muscle ce qui aidera à la compréhension de son mécanisme d'oxydation *in situ*.

Reçu pour publication en octobre 1977.

Remerciements

Nous remercions l'équipe de M. BELLANGER pour les dosages effectués par absorption atomique.

Summary

Fast preparaton of unoxydised myoglobin from bovine, ovine and pork muscle

This investigation was undertaken to determine a fast method of purification of the myoglobins of bovine, ovine and pork muscle which allows the maintenance of the iron in the ferrous form.

The purification was carried out by means of the CM ou DEAE-cellulose chromatography eluted by simultaneous variation of the ionic strength and the pH, and by means of a Sephadex G 50 gel chromatography.

The purified pigment has a ratio of E_{410}/E_{280} greater than 3. The polyacrylamid gel electrophoresis and isoelectrofocusing patterns show many isoelectric bands which illustrate the micro-hetero-geneity of the pigment. The determination of the iron content of the purified myoglobins of the bovine, ovine and pork muscle point out an average value of 0,334 p. cent which corresponds to the minimal molecular weight of 16 770. After the purification, the percentage of oxymyoglobin is very near of 90 p. 100.

Références bibliographiques

AKESON A., THEORELL H., 1960. On the microheterogeneity of horse myoglobin. *Arch. Biochem. Biophys.*, **91**, 319-325.

ANTONINI E., BRUNORI M., 1971. Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands. *North Holland Publi Comp.*, p. 8.

ATASSI M. Z., TARLOWSKI D. P., PAULL J. H., 1970. Immunochemistry of sperm whale myoglobin. 7, Correlation of immunochemical cross reactions of eight myoglobins with structural similarity and its dependance on conformation. *Bioch. Biophys. Acta*, **221**, 623-635.

BERNARD S., HAVEZ R., DAUTREVAUX M., BISERTE G., 1961. Étude sur la myoglobine . III. Propriétés comparées des myoglobines de cheval, de bœuf, de mouton et de porc. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **43**, (12), 1281-1287.

BERNARD S., BOULANGER Y., DAUTREVAUX M., BISERTE G., 1961. Études sur la myoglobine. IV. Hydrolyses enzymatiques de myoglobines de cheval, de bœuf, de mouton et de porc. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **43**, (12).

BROWN W. D., 1961. Chromatography of myoglobin on diethylaminoethyl cellulose columns *J. Biol. Chem.*, **236** (8), 2238-2240.

CAMERON B. C., 1965. Determination of iron in heme compounds. II. Hemoglobin and myoglobin. *Anal. Biochem.*, **11**, 164-165.

FELLAND H. S., SNYDER H. E., 1968. Effect of pH and column size on CM cellulose chromatography of bovine myoglobin. *J. Chromatog.*, **38**, 250-256.

HAN K., DAUTREVAUX M., CHAILA X., BISERTE G., 1970. The covalent structure of beef heart myoglobin. *Eur. J. Biochem.*, **16**, 465-471.

HAN K., TETAERT D., DAUTREVAUX M., MOSCHETTO B., BISERTE G., 1971. The partial amino acide sequence of sheep heart myoglobin. *FEBS Letters*, **15**, 116-117.

HARDMAN K. D., EYLAR E. H., RAY D. K., BANASZAK J. L., GURD F. R., 1966. Isolation of sperm whale myoglobin by low temperature fractionnation with ethanol and metallic ions. *J. Biol. Chem.*, **241**, (2), 432-441.

KEILIN J., SCHMID K., 1948. Crystallization whale myoglobin. *Nature*, vol. 162, 496-497.

KENDREW J. C., PARRISH R. G., MARRACK J. R., ORLANS E. S., 1954. The species specificity of myoglobin. *Nature*, **174**, 946-949.

MORGAN V. E., 1935. Studies on myoglobin. I. The solubility of myoglobin in concentrated ammonium sulfate solutions. *J. Biol. Chem.*, **112**, 557-561.

NAKANISHI T., IZUMIMOTO M., 1972. Crystallization and physical characterization of porcine myoglobin. *Agric. Biol. Chem.*, **36**, (9), 1505-1510.

PAN B. S., SOLBERG M., 1972. The effect of pH on bovine oxymyoglobin structure and stability. *J. Food Sci.*, **37**, 29-32.

QUINN J. R., 1973. Conversion of bovine myoglobin into multiple charge-heterogenous subfractions. *J. Food Sci.*, **38**, 287-293.

QUINN J. R., PEARSON A. M., 1964. Characterization studies of three myoglobin fractions from bovine muscles. *J. Food Sci.*, **29**, (4), 429-434.

QUINN J. R., PEARSON A. M., BRUNNER J. R., 1964. Detection and isolation of multiple myoglobins from beef muscle. *J. Food Sci.*, **29**, (4), 422-428.

ROCHE J., DERRIEN Y., MOUTTE M., 1941. Solubilités dans les solutions salines concentrées et caractères spécifiques des hémoglobines sanguines. I. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **23**, 114-1129.

ROSSI-FANELLI A., 1949. Haemoglobin (Butterworths London), p. 115.

RUMEN N. M., 1959. Isolation of five myoglobins from seal (*Phoca vitulina*). *Acta Chem. Scand.*, **13**, 1542-1546.

SATTERLEE L. D., LILLARD H. S., SNYDER H. E., 1969. Separation of microheterogeneous components of bovine metmyoglobin and investigation of possibles causes of the microheterogeneity. *Life Sci.*, **8**, part. II, 871-884.

SATTERLEE L. D., ZACHARIAH N. Y., 1972. Porcine and ovine myoglobin: isolation, purification, characterization and stability. *J. Food Sci.*, **37**, 909-912.

THEORELL A. H. T., 1932. Kristallinisches myoglobin. I. Kristallinisches und Reinigung des Myoglobins sowies vorlävfige Mitteilung über sein Molekulargewicht. *Bioch. Ztschr.*, **252**, 1-7.

THEORELL A. H. T., AKESON A., 1955. *Biochemistry of nitrogen* (Inomalainen Tiedeakademia Helsinki), p. 303.

VAN DEN OORD A. H. A., WESDORP J. J., VAN DAM A. F., VERHEIJ J. A., 1969. Occurence and Nature of equine and bovine myoglobin dimers. *Europ. J. Biochem.*, **10**, 140-145.

VESTERBERG O., 1967. Isoelectric fractionation, analysis and characterization of ampholytes in natural pH gradients. V. Separation of myoglobins and studies on their electrochemical differences. *Acta Chem. Scand.*, **21**, 206-216.

VESTERBERG O., 1972. Isoelectric focusing of proteins in polyacrylamide gels. *Bioch. Biophys. Acta*, **257**, 11-19.

YAMAZAKI I., YOKOTA K. N., SHIKHAMA K., 1964. Preparation of crystalline oxymyoglobin from horse heart *J. Biol. Chem.*, **239**, (12), 4151-4153.

Ann. Technol. Agric., 1977, **26** (4), 435-447

Croissance des bactéries lactiques à partir des principaux constituants azotés du vin

M. FEUILLAT, P. BIDAN et Y. ROSIER

avec la collaboration technique de C. HORY

Laboratoire d'Œnologie, Faculté des Sciences, Reims,
Station de Technologie des Produits Végétaux, INRA Dijon,
Laboratoire de Chimie-Technologie, E.N.I.T.A., Dijon.

Résumé

Les trois principales fractions azotées d'un vin de Bourgogne Aligoté : protéines, peptides, acides aminés sont séparées par chromatographie sur Sephadex G 25 et utilisées comme source d'azote, dans des conditions de pH voisines de celles du vin (pH 3,3 à 3,7), pour la culture de quatre souches de bactéries lactiques : *L. lantarum*, *L. fermenti*, *L. cerevisiae*, *L. œnos*.

Il apparaît que les peptides d'un poids moléculaire inférieur à 1 000 U constituent, aux concentrations présentes dans le vin (77 mg/l N), un substrat azoté suffisant pour la croissance des quatre espèces bactériennes. Par contre, les acides aminés libres, bien que représentant une fraction azotée plus abondante (215 mg/l N), permettent seulement le développement des coques. Les composés azotés d'un poids moléculaire supérieur ou égal à 5 000 U ne sont pas assimilables.

En réalité, les éluats de Sephadex utilisés en culture apportent, outre les constituants azotés du vin, des composés présents à l'état de traces qui jouent le rôle de facteurs de croissance. Ainsi, la fraction peptidique est éluée en mélange avec de petites quantités de nucléotides, dont la présence dans le milieu de culture semble nécessaire à la multiplication cellulaire. De même, un mélange d'acides aminés purs, de composition identique à celui qui est séparé du vin, a une moins bonne valeur nutritionnelle vis-à-vis de la croissance des coques.

Enfin, l'assimilation des peptides en milieu acide par les bactéries lactiques n'apparaît possible qu'en présence de petites quantités d'oligopeptides (5 mg/l N) séparés par chromatographie sur Sephadex G 10, ce qui laisse supposer le caractère auxotrophe des souches essayées.

Mots-clés : *bactéries lactiques, croissance, vin, constituants azotés.*

I. — Introduction

La nutrition azotée des bactéries lactiques du vin a déjà fait l'objet de nombreuses études, notamment en ce qui concerne les besoin en acides aminés. Ainsi, Peynaud *et al.* (1965) observent d'après l'étude de 64 souches différentes que les coques sont plus exigeants que les bacilles, 11 acides aminés étant indispensables

à la croissance des premiers et 4 seulement à la croissance des seconds. Plus récemment, KUENSCH *et al.* (1974) montrent que durant la fermentation malo-lactique, l'arginine acide aminé particulièrement abondant du vin, n'était pas directement assimilable par *Leuconostoc oenos*, mais pouvait être dégradé stoechiométriquement en ornithine et ammoniac selon le cycle de l'urée.

D'autres auteurs comme LUTHI et VETSCH (1959), DUPUY et MELAMED (1959) ont mis en évidence le rôle particulièrement important des peptides pour la croissance des bactéries lactiques, les fractions les plus stimulantes étant des oligopeptides présents dans les hydrolysats trypsiques de caséine tels que la bactotryptone.

Aucune étude, à notre connaissance, n'avait encore été entreprise sur l'assimilation par les bactéries lactiques des différentes fractions azotées : azote protéique azote peptidique, acides aminés... contenues dans le vin lui-même. Des travaux antérieurs (FEUILLAT, 1974) nous ayant conduit à séparer par des méthodes physiques ces principaux constituants azotés du vin, il nous a paru intéressant d'étudier la croissance des bactéries lactiques sur des milieux de culture renfermant comme seule source d'azote, ces différents constituants et dans des conditions de pH voisines de celles du vin.

II. — Matériel et méthodes

A. — *Substrats azotés*

1° *Vin.*

Le vin utilisé est un vin de Bourgogne Aligoté de la récolte de 1975, soutiré immédiatement en fin de fermentation alcoolique et conservé à l'état congelé sans avoir effectué sa fermentation malo-lactique.

Ses caractéristiques azotées sont les suivantes :

— azote total (Kjeldahl) : 355 mg/l N,
— azote titrable par le formol (Sörensen) : 196 mg/l N.

2° *Autolysats de levures.*

Une culture de levures contenant 10^8 cellules par ml est obtenue en fermenteur sur jus de raisin enrichi en phosphate d'ammonium et avec agitation, pendant 48 heures à 26 °C. Ces cellules sont séparées du milieu de culture par centrifugation stérile (5 min. à 5 000 tours/min), lavées deux fois par de l'eau stérile, puis remises en suspension dans 1 l de tampon acétate pH 5, qui est réparti en deux fractions de 500 ml.

Ces fractions sont mises à incuber au bain-marie à 45 °C, pour l'une pendant 24 heures, et pour l'autre pendant 48 heures. Les résidus solides sont éliminés par centrifugation.

Nous avons ainsi obtenu deux autolysats dont les compositions azotées sont les suivantes :

— autolysat n° 1 : azote total (Kjeldahl) : 91 mg/l N
azote titrable par le formol : 41 mg/l N
— autolysat n° 2 : azote total (Kjeldahl) : 614 mg/l N
azote titrable par le formol : 330 mg/l N.

3° *Hydrolysat trypsique.*

Il s'agit de la bactotryptone « DIFCO » dont la composition en azote, en pourcentages de matière sèche, est la suivante :

— azote total : 13,14 p. 100.
— azote peptidique : 11,29 p. 100.
— acides aminés libres (VAN SLYKE) : 4,73 p. 100.
— azote ammoniacal : 0,02 p. 100.

B. — *Souches de bactéries lactiques*

Les cultures sont réalisées avec quatre souches de bactéries lactiques :

— *Lactobacillus plantarum B 4257*, bacille homofermentaire isolé par l'Eidg. Technische Hochschule de Zurich,

— *Lactobacillus fermenti ATCC 9338*, bacille hétérofermentaire,

— *Pedioccus cerevisiae*, coque homofermentaire isolé d'un vin du Beaujolais,

— *Leuconostoc oenos 15 10A*, coque hétérofermentaire provenant de la collection de la Station de Technologie des Produits Végétaux de Dijon.

Ces souches sont conservées par repiquage mensuel sur un milieu au lait digéré à la papaïne (28 g/l), gélosé à 15 g/l, proposé par GUITTONEAU et CHEVALIER (1940) et enrichi en extrait de levure (1 g/l), saccharose (5 g/l), glucose (15 g/l), et jus de tomate (100 ml/l). Ce même milieu sera utilisé à l'état liquide comme milieu témoin, compte tenu de sa grande richesse en azote (1 400 mg/l N).

C. — *Méthodes*

1° *Séparation et dosage des constituants azotés du vin.*

Les constituants azotés de 100 ml de vin préalablement concentrés sous vide à 10 ml sont séparés en fonction de leur poids moléculaire sur une colonne de Sephadex G 25 de 100 cm de longueur et de 4,5 cm^2 de section, et dont le volume d'exclusion est déterminé par passage d'une solution de dextrane bleu à 2 p. 100. L'élution est effectuée avec un débit de 40 ml/heure, à l'aide d'un mélange de tampon acétate pH 6 et de NaCl 0,1 M (vol./vol). L'éluat est collecté par fractions de 3 ml et analysé successivement par absorption dans l'ultraviolet (278 nm), par coloration à la ninhydrine selon la technique de MOORE et STEIN (1954) et par coloration à l'orcinol selon la technique de MOULE (1953).

L'azote contenu dans les principaux groupes de fractions repérés dans l'éluat de Sephadex est dosé en continu selon la réaction colorée de BERTHELOT à l'aide d'une chaîne d'analyse automatique séquentielle (Technicon), équipée d'un module de minéralisation.

La même chaîne d'analyse est utilisée pour le dosage à la ninhydrine des acides aminés du vin préalablement séparés sur résine échangeuse de cations.

Les peptides du vin sont purifiés d'une part par ultra-infiltration sur une membrane Millipore « Pellicon type PSAC » qui permet la rétention des composés d'un poids moléculaire supérieur à 1 000 U, et d'autre part par chromatographie

sur colonne de Sephadex G 10, utilisée dans les mêmes conditions que le Sephadex G 25, et qui assure l'exclusion des composés d'un poids moléculaire supérieur à 700 U.

2° *Cultures microbiennes.*

Les souches de bactéries lactiques sont cultivées sur le milieu Bacto Carbon Base (DIFCO) dont la seule source d'azote est constituée par l'apport des fractions de l'éluat de la colonne de Sephadex G 25 renfermant les principaux constituants azotés du vin.

Ces fractions d'éluat sont d'abord concentrées sous vide, filtrées stérilement sur une membrane Millipore d'un diamètre de pores de 0,22 μ puis incorporées à une solution de Bacto Carbon Base à 23,4 g/l, de telle façon que le milieu de culture ainsi constitué contienne à la même concentration que le vin la fraction azotée considérée : protéines, peptides ou acides aminés. Le pH est ajusté avec une solution d'acide sulfurique ou de soude (10 p. cent) à pH 3,3 pour les cultures de lactobacilles et de *Leuconostoc oenos* et à pH 3,7 pour les cultures de *Pediococcus cerevisiae* dont la croissance est nulle à des pH inférieurs.

D'une façon semblable des cultures sont effectuées sur le milieu Bacto Carbon Base enrichi à 90 mg/l d'azote par les autolysats de levure ou par la bactotryptone dont les compositions ont été données plus haut.

Pour chaque essai, deux cultures témoins de la souche testée sont conduites au même pH, d'une part sur une solution de Bacto Carbon Base à 11,7 g/l, sans aucun apport d'azote, et d'autre part, sur le milieu lait digéré à la papaïne riche en azote.

Après divers essais de chauffage des milieux de culture, nous avons retenu l'autoclavage à 100 °C pendant une minute seulement afin d'éviter l'hydrolyse des protéines. Les ensemencements sont faits à des taux maximum de 10^5 cellules par ml à partir de précultures des bactéries lactiques conduites sur lait digéré à la papaïne liquide. Les cultures sont placées à l'étuve à 28 °C.

En fin d'incubation, chaque culture sert à préparer une série de dilutions, qui sont elles-mêmes utilisées pour l'ensemencement de lait digéré à la papaïne gélosé coulé en boîtes de Pétri (2 boîtes par dilution) et placé à l'étuve à 28 °C. Le comptage des colonies est effectué lorsque celles-ci sont bien visibles, c'est-à-dire après 5 jours au minimum pour les lactobacilles et après 8 jours au minimum pour les coques. La population de la culture initiale est calculée en faisant la moyenne du nombre de colonies des deux boîtes préparées à partir de la même dilution.

III. — Résultats

1 *Composition azotée du vin*

La figure 1 correspond à la chromatographie sur colonne de Sephadex G 25 de 100 ml de vin préalablement concentrés sous vide à 10 ml. L'absorption de l'éluat à 278 nm permet de repérer trois groupes de fractions qui renferment respectivement les principaux constituants azotés.

La fraction I correspond au volume d'exclusion de la colonne dans lequel

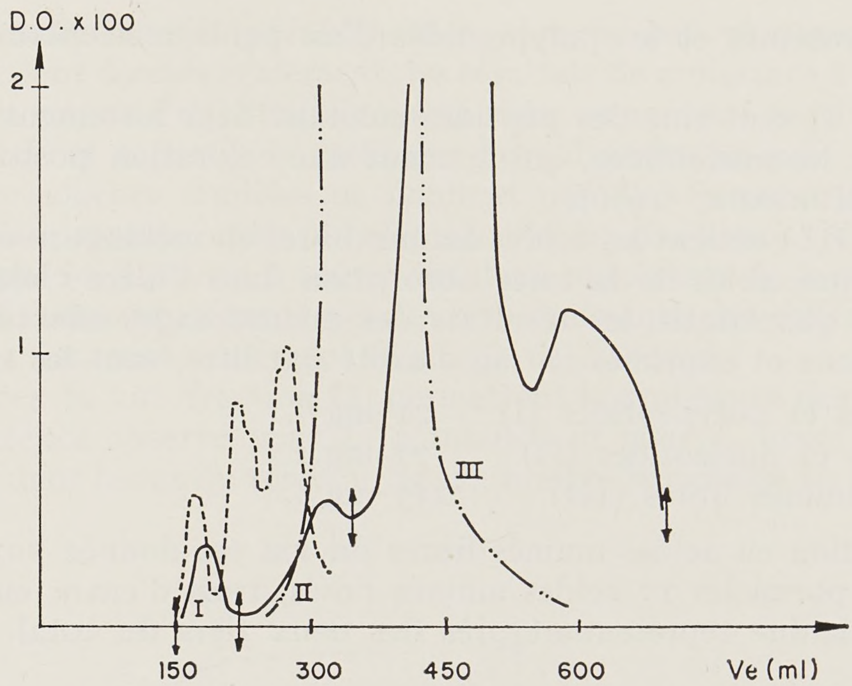


FIG. 1. — *Chromatographie sur Sephadex G 25 de 100 ml de vin (concentrés à 10 ml) :*

——— Absorption à 278 nm.
..—..— Coloration à la ninhydrine.
------ Coloration à l'orcinol.
←→ Séparation des fractions.

TABLEAU I

Composition en acides aminés libres du vin

Acides aminés	p. cent	mg d'azote /l	mg /l
Lysine	5	9,5	50
Histidine	1,3	4,3	15,5
Arginine	22,5	87,5	272
Acide ospartique	2	2	19,6
Thréonine	1,6	1,5	11,8
Serine	1,4	1,2	10,3
Acide glutamique	7,6	7,2	77,2
Proline	24,5	23,8	195,5
Glycine	4,9	5	26,3
Alanine	13,7	13,3	84,5
Cystine	0,8	1,4	11,9
Valine	1,7	1,7	14,8
Méthionine	1	1,1	11,3
Isoleucine	1,4	2,1	19,7
Leucine	5,6	5,4	52,5
Tyrosine	2,4	2,5	31,7
Phénylalanine	2,6	2,5	29,1
Total	100	172	933,7

sont élués les protéines et les polypeptides d'un poids moléculaire supérieur ou égal à 5 000 U.

La fraction II renferme des peptides colorant déjà fortement la ninhydrine en mélange avec les nucléotides, qui donnent une coloration positive à l'orcinol (FEUILLAT et MORFAUX, 1976).

La fraction III contient les acides aminés libres en mélange avec les composés phénoliques, responsables de la forte absorption dans l'ultra-violet.

Sur le plan quantitatif, les résultats des microdosages effectués sur chaque groupe de fractions et exprimés en mg d'azote par litre, sont les suivants :

— Protéines et polypeptides (I) : 21 mg/l.
— Peptides et nucléotides (II) : 77 mg/l.
— Acides aminés libres (III) : 215 mg/l.

La composition en acides aminés libres du vin est donnée sur le tableau 1 Il apparaît que parmi les 17 acides aminés dosés, trois d'entre eux : l'arginine la proline et l'alanine représentent près des deux tiers du total.

2. *Croissance des bactéries lactiques*

Les résultats des études de croissance des quatre souches de bactéries lactiques sont données sur le tableau 2. Ce tableau permet de comparer entre elles, et pour des concentrations identiques à celles du vin, les valeurs nutritionnelles des prin-

TABLEAU 2

Croissance des bactéries lactiques à partir des différents substrats azotés

	Substrat azoté	Azote (mg/l)	*L. plantarum*	*L. fermenti*	*P. cerevisiae*	*L. oenos*
	Lait digéré à la papaïne	1 400	$2{,}8 \cdot 10^8$	$1{,}1 \cdot 10^8$	$6{,}5 \cdot 10^7$	$3{,}8 \cdot 10^7$
Fractions azotées du vin	Protéines (I)	21	0	0	0	0
	Peptides + nucléotides (II)	77	$7 \cdot 10^7$	$6 \cdot 10^6$	$1{,}6 \cdot 10^6$	$3{,}3 \cdot 10^7$
	Acides aminés (III)	215	0	0	$1{,}8 \cdot 10^8$	$2{,}4 \cdot 10^7$
	(II) + (III)	146	$3{,}8 \cdot 10^8$	$9 \cdot 10^4$	$1{,}6 \cdot 10^8$	$1{,}7 \cdot 10^8$
	(II) purifiée sur Sephadex G 10	72	0	0	0	0
Autolysats de levures	Autolysat n° 1 peu dégradé	90	0	0	0	$8{,}2 \cdot 10^5$
	Autolysat n° 2 très dégradé	90	$3 \cdot 10^7$	$3 \cdot 10^6$	$6{,}5 \cdot 10^6$	$7 \cdot 10^7$
Acides aminés purs	Mélange identique au vin (17 ac. aminés)	215	0	0		0
	Mélange identique au vin enrichi (+ 11 ac. aminés* × à 1 mg/l N)	226	0	0	0	0

(*) Cystéine, glutamine, asparagine, citrulline, taurine, norleucine, norvaline, oxyproline, hydroxyproline, ornithine, homosérine.

cipaux constituants azotés préalablement séparés par chromatographie. Pour chaque souche, sont donnés également, les résultats de croissance à partir du milieu « lait digéré à la papaïne » particulièrement riche en azote, à partir des deux autolysats de levures, et à partir de mélanges purs d'acides aminés.

Les quatre souches étudiées ne donnent pas de croissance avec pour seule source d'azote les protéines et les polypeptides du vin (fraction I). Cette observation est confirmée par les cultures à partir des deux autolysats de levure. Seul l'autolysat n° 2, suffisamment dégradé permet une croissance des différentes bactéries, l'autolysat n° 1 assurant seulement la survie de *L. oenos*.

Les peptides du vin (fraction II) permettent la croissance des quatre souches, le temps de latence observé pour *L. plantarum* et pour *L. oenos* étant d'ailleurs plus court que dans le cas du témoin (fig. 2), malgré la richesse en azote nettement

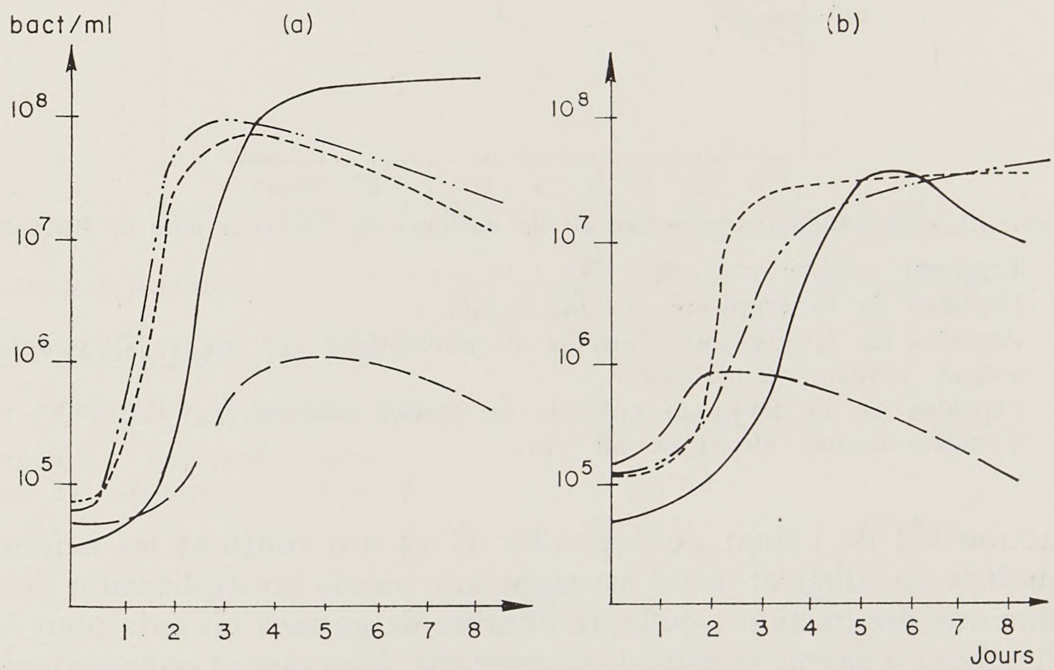


FIG. 2. — *Croissance de* Lactobacillus plantarum (*a*) *et de* Leuconostoc oenos (*b*) *à partir des peptides du vin :*

——— Témoin (lait digéré à la papaïne).
--------- Peptides totaux du vin (fraction II d'éluat de Sephadex G 25).
—··— Peptides de PM < 1 000.
— — — Peptides de PM ⩾ 1 000.

plus importante de celui-ci : 1 400 mg/l contre 77 mg/l seulement pour la fraction considérée. Ce sont les peptides de plus faibles poids moléculaire qui jouent le rôle le plus important, puisque après élimination des composés d'un poids moléculaire supérieur ou égal à 1 000 U par ultra-infiltration, la multiplication cellulaire reste sensiblement la même.

Toutefois, des peptides de poids moléculaire comparable à ceux du vin mais ne renfermant pas de fractions positives à l'orcinol, isolés par chromatographie sur Sephadex G 25 à partir de la bactotryptone, assurent seulement une faible multiplication de *L. oenos* (fig. 3). L'enrichissement en nucléotides de cette fraction peptidique stimule assez fortement la croissance, alors qu'au contraire l'addition d'un mélange d'acides aminés de composition identique à celle du vin, réduit d'un facteur supérieur à 10, le nombre de cellules produites.

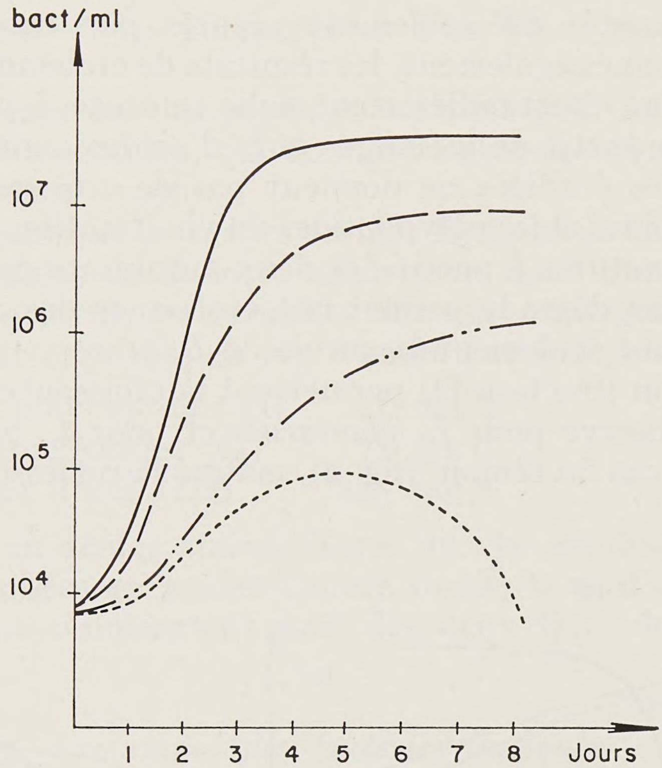


FIG. 3. — *Croissance de* Leuconostoc oenos *sur des milieux de culture à base de* Bactotryptone :

———— Tryptone entière (90 mg/1 N).

—.—— Peptides de la tryptone (27 mg/1 N).

— — — Peptides de la tryptone enrichis en nucléotides (57 mg/1 N): guanidine, adenosine, cytosine à 20 mg/1.

-------- Peptides de la tryptone enrichis en acides aminés (147 mg/1 N) : mélange d'acides aminés identique au vin.

La fraction III de l'éluat de Sephadex G 25 qui contient les acides aminés du vin, constitue un substrat azoté assurant une bonne multiplication des coques, mais entraîne une diminution rapide du nombre de germes vivants pour les lactobacilles. Cherchant à savoir si dans ce dernier cas, et comme l'ont supposé DUPUY (1959) et DOMERCQ *et al.* (1959), les polyphénols élués en mélange avec les acides aminés du vin ne jouent pas un rôle d'inhibiteur de croissance, nous avons remplacé la fraction d'éluat par un mélange d'acides aminés purs de composition qualitative et quantitative identiques. La croissance des deux souches de lactobacilles n'a pas été améliorée, la vitesse de mortalité étant même plus rapide que dans le cas des cultures précédentes. Par ailleurs, le même mélange d'acides aminés purs, voire même un mélange enrichi avec 11 acides supplémentaires non identifiés dans le vin utilisé, ne permet pas non plus la croissance de *L. oenos.*

Notons enfin que le mélange des fractions II et III de l'éluat de Sephadex G 25, apportées au milieu de culture dans les proportions respectives de 38,5 mg/l N et de 106,5 mg/l N, constitue le substrat azoté le plus complet pour la croissance bactérienne, celle-ci étant même, sauf pour *L. fermenti,* supérieure à celle obtenue sur le milieu « lait digéré à la papaïne ».

3. *Mise en évidence de facteurs de croissance de nature oligopeptidique*

La fraction II de l'éluat de Sephadex G 25 renfermant les peptides et les nucléotides du vin est concentrée sous vide à 10 ml, puis chromatographiée sur une colonne de Sephadex G 10. L'étude de l'éluat par absorption dans l'ultraviolet et par coloration à la ninhydrine permet de révéler deux fractions (fig. 4).

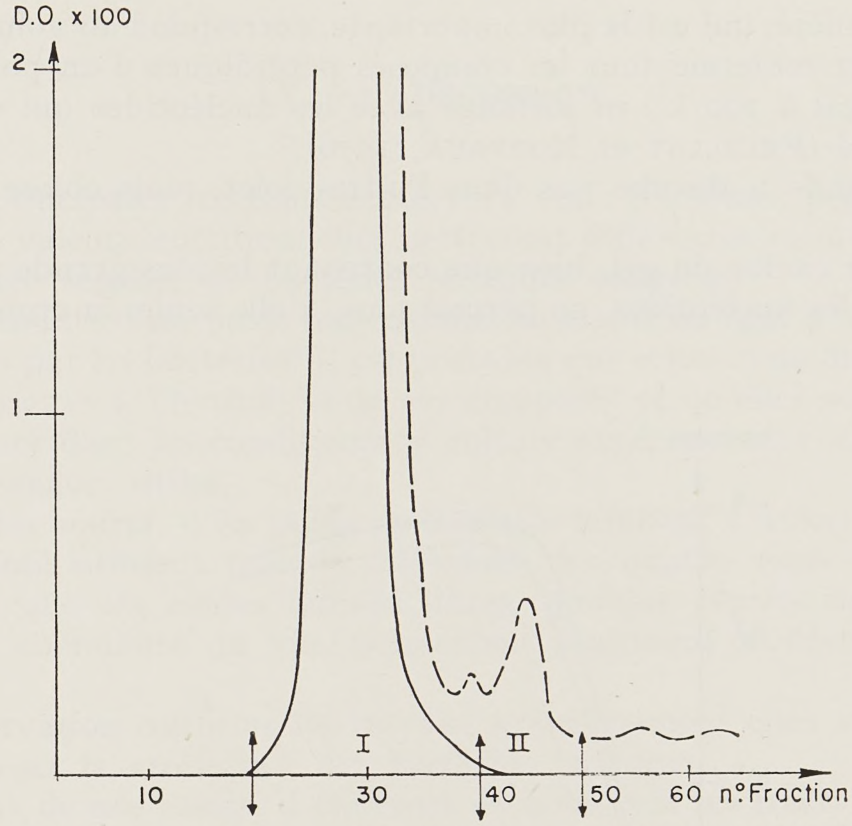


FIG. 4. — *Chromatographie sur Sephadex G 10 de la fraction II de l'éluat de Sephadex G 25, concentrée sous vide à 10 ml :*

——— Absorption à 278 mm.

— — — Coloration à la ninhydrine.

Fraction I : composés exclus.
Fraction II : composés non exclus.

TABLEAU 3

Analyse des acides aminés de la fraction II de l'éluat de Sephadex G 10, Hydrolyse en milieu HCl 6N à 110 °C pendant 24 heures

Acides aminés	Teneurs du vin	
	mole/l	µg/l N
Acide aspartique	1,68	233,6
Thréonine	1,72	204,9
Sérine	3,12	327,9
Acide glutamique	2,08	306,0
Glycine	2,48	186,2
Alanine	1,40	124,7
Valine	0,92	107,8
Isoleucine	0,52	68,2
Leucine	0,80	104,9
Tyrosine	0,40	32,5
Phénylalanine	0,60	99,1
Ornithine	1,28	169,1
Lysine	1,96	286,5
Histidine	1,56	202,5
Arginine	15,28	2 661,8
Total	35,80	5 115,7

— La première, qui est la plus importante, correspond au volume d'exclusion de la colonne et renferme tous les composés peptidiques d'un poids moléculaire supérieur ou égal à 700 U, en mélange avec les nucléotides qui sont également exclus de ce gel (FEUILLAT et MORFAUX, 1976).

— La seconde n'absorbe pas dans l'ultra-violet, mais colore faiblement la ninhydrine.

La fraction exclue du gel, bien que contenant la plus grande partie des peptides du vin et les nucléotides, ne permet plus, à elle seule, la croissance des bac-

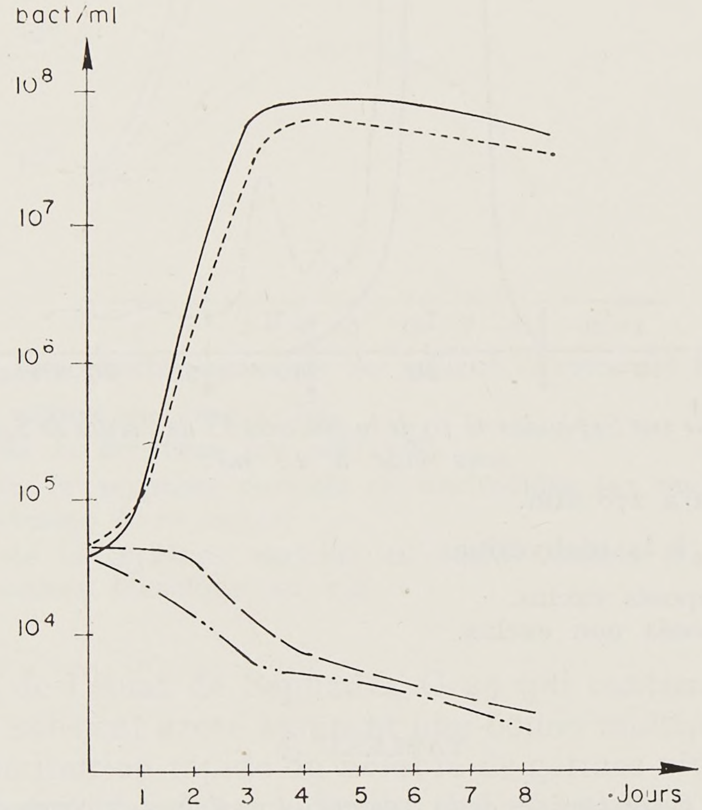


FIG. 5. — *Croissance de* lactobacillus plantarum *sur les fractions d'éluat de Sephadex G 25 et de Sephadex G 10 renfermant les peptides et les oligopeptides du vin :*

——— Fraction II de l'éluat de Séphadex G 25.

.—.— Fraction I de l'éluat de Séphadex G 10.

------- Fractions I + II de l'éluat de Séphadex G 10.

— — — Fraction I de l'éluat de Séphadex G 10 + 28 acides aminés.

téries (fig. 5). L'addition au milieu de culture de la deuxième fraction rétablit la multiplication cellulaire, alors que l'enrichissement en 28 acides aminés libres n'a aucun effet sur la croissance.

Cette deuxième fraction, bien que peu importante quantitativement, joue donc le rôle de facteur de croissance. Son analyse par hydrolyse et chromatographie sur échangeur d'ions met en évidence la présence d'acides aminés à la dose de 5 mg/l d'azote environ (tabl. 3). Ces acides aminés sont vraisemblablement associés sous la forme d'oligopeptides, puisque l'analyse de la fraction sans hydrolyse préalable ne permet pas la révélation à la ninhydrine.

IV. — Discussion

Les trois principales fractions azotées du vin : protéines, peptides et acides aminés ont des valeurs nutritionnelles nettement différentes vis-à-vis de la croissance des quatre souches de bactéries lactiques cultivées.

Les constituants d'un poids moléculaire supérieur ou égal à 5 000 U ne sont pas assimilables par les bactéries. Il est probable que celles-ci ne disposent pas des protéases nécessaires à l'hydrolyse de ces composés et qu'elles soient incapables de les synthétiser dans les conditions de culture expérimentées (absence des facteurs de croissance utiles).

Les peptides courts, d'un poids moléculaire inférieur à 1 000 U, constituent un substrat azoté suffisant pour la croissance des quatre espèces bactériennes essayées, alors que les acides aminés libres, quoique représentant la fraction azotée la plus abondante du vin, permettent seulement le développement des coques.

Cette observation confirme les travaux précédemment cités sur l'importance des peptides pour la croissance des bactéries lactiques.

Dans le cas de nos essais, il convient de noter que les fractions séparées du vin par chromatographie ne renferment pas une seule catégorie de constituants : peptides ou acides aminés, mais elles contiennent également à l'état de traces, des composés qui jouent le rôle de facteurs de croissance.

Ainsi, la fraction II renferme en mélange avec les peptides du vin, de petites quantités de nucléotides révélés à l'orcinol, qui peuvent, comme l'ont montré PEYNAUD et DOMERCQ (1961), avoir un effet stimulant sur la croissance bactérienne. Nous avons d'ailleurs observé qu'une fraction peptidique de poids moléculaire comparable à celle du vin, mais négative à l'orcinol, isolée à partir de la bactotryptone, devait nécessairement être enrichie en nucléotides pour assurer une multiplication cellulaire.

De même, la fraction III qui contient les acides aminés libres du vin permet la croissance des coques, alors qu'un mélange d'acides aminés purs de composition identique n'assure pas cette croissance. Cette remarque laisse supposer la présence dans la fraction considérée de facteurs croissance qui ne sont pas de nature aminée.

Enfin, la mise en évidence par chromatographie sur colonne de Sephadex G 10, d'une fraction oligopeptidique, dont la présence dans le milieu de culture est obligatoire pour l'assimilation des peptides de plus haut poids moléculaire, indique le caractère auxotrophe des souches. DESMAZEAUD et HERMIER (1973) ont déjà observé, dans le cas de *S. thermophilus*, que des peptides de structure particulière peuvent apporter un acide aminé essentiel aux cellules. Toutefois, en ce qui concerne nos essais, la fraction d'oligopeptides considérée ne peut être remplacée pour les cultures, par un mélange de 28 acides aminés purs.

V. — Conclusion

Parmi les constituants azotés du vin, les peptides courts, d'un poids moléculaire inférieur à 1 000 U, apparaissent comme une source de nutriments azotés suffisante pour la croissance des quatre espèces de bactéries lactiques essayées.

Par contre, les acides aminés libres, qui cependant dans le vin représentent une fraction azotée plus abondante, n'ont pas permis la multiplication des deux souches de lactobacilles.

Indépendamment de la satisfaction des besoins azotés, il y a lieu de considérer l'importance des facteurs de croissance contenus dans le vin. Ainsi, *L. oenos* se multiplie sur la fraction III de l'éluat de Sephadex G 25 isolée du vin, mais ne se développe pas sur un mélange équivalent ou même enrichi d'acides aminés purs. De même, la présence de petites quantités de nucléotides dans la fraction II renfermant les peptides du vin stimule vraisemblablement la croissance.

Enfin, les quatre souches étudiées peuvent être considérées comme auxotrophe pour l'assimilation des peptides, celle-ci n'étant possible qu'en présence d'oligopeptides d'un poids moléculaire inférieur à 700 U.

Les divers essais réalisés ont d'autre part montré que *L. oenos* était la bactérie la plus résistante aux faibles valeurs de pH, et la moins exigeante en ce qui concerne les besoins azotés, ce qui peut expliquer sa fréquence assez grande dans les vins en cours de fermentation malo-lactique.

Reçu pour publication en octobre 1977.

Summary

Growth of lactic bacteria from wine main nitrogen components.

The three main nitrogen fractions of a " Bourgogne Aligoté " wine: (proteins, peptides, amino-acids) are separated by Sephadex G 25 chromatography and used as nitrogen source in pH conditions rather similar to wine (pH 3,3 to 3,7) for the culture of four lactic bacteria strains: *L. plantarum*, *L. fermenti*, *L. cerevisiae*, *L. oenos*.

It appears that peptides, with a molecular weight below 1 000 U and at concentrations encountered in wine (77 mg/l), form a nitrogen substrate sufficient for growth of the four bacterial strains. On the contrary, free amino-acids, which bring more nitrogen (215 mg/l), allow only husks development. Nitrogen compounds having a molecular weight higher or equal to 5 000 U are not assimilated.

In fact, Sephadex eluates used for culture, bring, in addition to wine nitrogen components, other traces compounds which act as grow-factors. So, the eluted peptidic fraction contains small amounts of nucleotides, which seem useful for cells multiplication.

In the same way, a mixture of pure amino acids, bringing a composition similar to that of wine, acts as a less efficient nutrient for husks growth.

Lastly, peptides assimilation in acidic medium by lactic bacteria appears possible only in conjugation with small amounts of oligopeptides (5 mg/1 N) isolated by Sephadex G 10 chromatography. This fact suppose that the tested strains are auxotrophic.

Références bibliographiques

DESMAZEAUD J., HERMIER J., 1973. Effect of peptids from glucagon on the growth of *Streptococcus thermophilus*. *Biochimie*, **55**, 679-684.

DOMERCQ S., SUDRAUD P., CASSIGNARD R., 1959. Sur la possibilité d'obtenir facilement la fermentation malo-lactique dans les vins. *84e Congrès Soc. Sav. Dijon*, 239-245.

DUPUY P., MELAMED N., 1959. La croissance de *Lactobacillus arobinosus* dans le jus de raisin. Influence du pH, de l'éthanol et d'un hydrolysat trypsique. *84e Congrès Soc. Sav. Dijon*, 263-274.

DUPUY P., 1959. Les germes de la fermentation malo-lactique. *Vignes et vins*, **80**, 33-37.

FEUILLAT M., 1974. Contribution à l'étude des composés azotés du moût de raisin et du vin. *Thèse Doct. Sc., Université de Dijon.*

FEUILLAT M., MORFAUX J.-N., 1976. Les nucléotides du vin. Séparation, concentration et analyse par chromatographie sur échangeur d'anions. *Connaiss. Vigne et vin*, nº 1, 33-49.

GUITTONEAU G., CHEVALIER R., 1940. Nouvelles techniques de préparation d'un milieu de culture à base de lait digéré. Le lait digéré à la papaïne. *Ann. Technol. Agr.*, **III**, 7-13.

KUENSCH U., TEMPERLI A., MAYER K., 1974. Conversion of arginine to ornithine during malolactic fermentation in red swiss wine. *Amer J. Enol. Viticult.*, **25**, 4, 191-193.

LUTHI H., VETSCH U., 1959. Contribution to knowledge of the malolactic fermentation in wines and ciders; II. — The growth promoting effect of yeast extract on lactic acid bacteria causing malolactic fermentation in wines. *J. Appl. Bact.*, **22** (3), 384-391.

MOORE S., STEIN W. H., 1954. *J. Biol. Chem.*, **211**, 907, cité par LOISELEUR J. Techniques de laboratoire, T.I., fasc. 2, 1103, Masson éd., Paris (1963).

MOULE Y., 1953. Arch. Sci. Physiol. **7**, 161. Cité par LOISELEUR J. Techniques de laboratoire. T.I., fasc. 2, 1194, Masson éd., Paris (1963).

PEYNAUD E., DOMERCQ S., 1961. Études sur les bactéries lactiques des vins. *Ann. Technol. Agr.*, **10**, 43-50.

PEYNAUD E., LAFON-LAFOURCADE S., DOMERCQ S., 1965. Besoins nutritionnels de soixante-quatre souches de bactéries lactiques isolées du vin. *Bull. O.I.V.*, **38**, 415, 945-958.

Ann. Technol. Agric., 1977, **26** (4), 449-460.

Influence de la fermentation continue sous pression de CO_2 sur la composition des eaux-de-vie de vin

M. MARINOV et T. IVANOV

Institut Supérieur des Industries alimentaires
26, boulevard Lénine, Plovdiv, Bulgarie

Résumé

Les eaux-de-vie, obtenues après distillation des vins issus de la fermentation sous pression de CO_2, comparées à celles provenant de vins vinifiés selon la méthode classique présentent des différences notables du point de vue composition et propriétés organoleptiques.

On observe :

— une augmentation de la teneur en esters et acides volatils,
— une diminution de la quantité d'alcools supérieurs, d'aldéhydes et d'acétals,
— l'amélioration du bouquet des eaux-de-vie jeunes.

Mots-clés : *eaux-de-vie de vin, composition, fermentation sous pression* CO_2.

Introduction

L'influence de la fermentation continue sous pression de CO_2 sur la composition des eaux-de-vie n'a à notre connaissance, jamais été étudiée. En effet, nous n'avons pas trouvé de travaux concernant la fermentation continue sous pression de CO_2 pour la production de vins destinés à la distillation et sur l'influence de cette fermentation sur la composition des eaux-de-vie de vin. NATCHEVA et NILOV (1974) observent que la fermentation continue à la pression atmosphérique permet d'obtenir un enrichissement des eaux-de-vie de vin en esters « œnanthiques »; ces auteurs proposent l'application de la fermentation en continue afin d'obtenir des eaux-de-vie de vin riches en constituants volatils lourds. En Moldavie, une installation pour la fermentation continue des vins blancs permet d'améliorer la qualité des eaux-de-vie (MALTABAR, FERTMAN, 1971). Le but de notre travail

est de suivre l'influence de la fermentation en continue sous pression de CO_2 sur la composition et la qualité des eaux-de-vie jeunes et après vieillissement en fût de chêne.

Matériel et méthodes

I. — Matériel

Nous avons réalisé ce travail au cours des vendanges 1971, 1972 et 1973 avec les cépages *Dimiat* et *Ugni blanc*, cépages les plus couramment utilisés pour la production de vins destinés à la distillation. Nous avons utilisé les vins issus de ces deux cépages après vinification d'une part en continue sous pression de CO_2; d'autre part, selon la méthode discontinue, ces derniers servant alors de témoins (IVANOV, MARINOV, 1976). Les vins d'essai et les vins témoins sont gardés de 20 à 25 jours sur lies, puis distillés avec leurs lies.

1. — *Appareil et protocole de distillation:*

L'appareil de distillation de type discontinu est de construction bulgare, sa capacité est de 1 500 litres. Les vins provenant de la vinification en continue ainsi que les témoins sont distillés selon la méthode charentaise. Le distillat coule dans une éprouvette munie d'un alcoomètre, ensuite dans un récipient permettant de mesurer avec précision les volumes de distillat recueilli.

2. — *Séparation des différentes fractions:*

a) *Fraction de « tête »:*

Pendant la distillation des vins vinifiés en continu et des témoins, nous avons mesuré le volume de cette fraction et réalisé la séparation lorsque celui-ci atteint 1 p. 100 en volume du vin introduit dans la chaudière. Cette fraction appelée « tête » est blanchâtre, parfois verdâtre, son degré alcoolique varie de 77 à 83^0 G. L.

b) *Fraction de « cœur »:*

Le « cœur » constituant la fraction de distillat clair et limpide possède un arôme très agréable, il est recueilli après la fraction de tête. Le titre alcoolique de cette fraction est au début de $77\text{-}80^0$ G. L. à la fin de 50^0 G. L. donnant ainsi un mélange de $65\text{-}67^0$ G. L. Pour les vins vinifiés en continu ainsi que pour les témoins, on recueille des volumes égaux de la fraction de « cœur » afin de comparer les différents constituants présents dans cette fraction.

c) *Fraction de « queue »:*

Cette fraction est recueillie après la fraction de « cœur » jusqu'à ce que l'éthanol du milieu soit épuisé. Les « queues » de distillation possèdent un titre alcoolique de $25\text{-}29^0$ G. L., une couleur verdâtre due au complexe du cuivre avec les acides gras.

II. — Méthodes

Après distillation, sur les différentes fractions, on réalise des prélèvements pour des analyses chimiques.

Pour les éléments retenus, les méthodes de dosage utilisées ont été les suivantes :

Alcool méthylique	Par colorimétrie, acide chromotropique (BOUZIGUES, 1955)
Alcools supérieurs	Méthode de PEYNAUD et GUIMBERTEAU, réactif de p. diméthylaminobenzaldéhyde.
Aldéhydes.	Méthode JAULMES ESPÉZEL.
Esters totaux	Méthode PEYNAUD.
Acétals	Méthode PEYNAUD.
Furfural	Méthode spectrophotométrique de ROMOS et GOMES.
Esters « œnanthiques ». .	Méthode de VISSOTSKA.
Fer.	Méthode au thiocyanate.
Cuivre	Méthode du diéthyldithiocarbamate de sodium.

Outre ces analyses classiques, la fraction de « cœur » est soumise à la dégustation.

Résultats

Les résultats d'analyse sur les fractions de « tête », de « cœur » et de « queue » sont présentés respectivement dans les tableaux 1, 2 et 3. Le tableau 4 représente les variations pondérales des différents constituants selon les deux méthodes de vinification; la figure 1 représente l'histogramme de ces composés.

1. — *Méthanol*

Dans les eaux-de-vie de marcs et de fruits, le méthanol est un constituant indésirable. Dans les eaux-de-vie de vins rouges, les teneurs en méthanol sont deux fois plus élevées que pour les eaux-de-vie de vins blancs.

Les résultats de nos recherches montrent une diminution de la teneur en méthanol pour les trois fractions provenant des vins vinifiés en continu par rapport à la méthode classique; dans notre travail précédent (IVANOV, MARINOV, 1976) nos expériences ont montré une diminution de la teneur en méthanol pour les vins issus de la fermentation en continue sous pression de CO_2.

L'histogramme montre que toutes les fractions de « cœur » provenant du cépage *Dimiat* présentent la diminution la plus importante (A_2, B_2, C_2); par contre pour le cépage *Ugni blanc* ce sont les fractions de « tête » A'_1 et B'_1 pour les vendanges de 1971 et 1972 et la fraction de « cœur » C'_2 pour la vendange de 1973.

TABLEAU I

Composition des fractions de « tête »

Constituants	*Dimiat*						*Ugni blanc*					
	Vendange 1971		Vendange 1972		Vendange 1973		Vendange 1971		Vendange 1972		Vendange 1973	
	Ferment. disc.	Ferment. cont.	Ferment. disc.	Ferment. cont.	Ferment. disc.	Ferment. cont.	Ferment. disc.	Ferment. cont.	Ferment. disc.	Ferment. cont.	Ferment. disc.	Ferment. cont.
Alcool éthylique (en degré G. L.)	80,42	80,04	82,48	82,26	80,16	80,02	77,32	78,54	83,48	83,72	79,07	79,20
Alcool méthylique (mg/l) . . .	936	620	720	594	960	860	752	440	596	450	1 064	700
Alcools supérieurs (mg/l) . . .	5 758	3 904	3 366	2 640	3 663	2 805	3 920	3 456	4 620	2 608	3 620	3 168
Acides volatils (mg/l)	141	157	130	150	164	180	112	136	180	204	164	186
Esters totaux (mg/l)	3 185,6	3 745,6	4 364	4 987	4 740	5 856	4 195,2	5 297,6	4 235	4 987	4 167	5 195
Aldéhydes (mg/l)	506	487,52	572	428	332,2	309	496,3	462,0	616	483	352	303,6
Acétals (mg/l)	70,8	62,95	38,68	34,28	53,6	46,64	43,04	37,14	51,68	30,16	71,2	60,24
Furfural (mg/l)	0	0,9	0	0	0	0	0,25	0	0	0	0	0,6
Cu (mg/l)	10,97	10,68	9,53	6,85	7,64	8,21	10,09	10,73	11,29	8,67	6,42	7,02
Fer (mg/l)	0,42	0,35	0,52	0,37	0,52	0,64	0,61	0,64	0,34	0,46	0,49	0,51

TABLEAU 2

Composition des fractions de « cœur »

Constituants	*Dimiat*						*Ugni blanc*					
	Vendange 1971		Vendange 1972		Vendange 1973		Vendange 1971		Vendange 1972		Vendange 1973	
	Ferment. disc.	Ferment. cont.	Ferment. disc.	Ferment. cont.	Ferment. disc.	Ferment. cont.	Ferment. disc.	Ferment. cont.	Ferment. disc.	Ferment. cont.	Ferment. disc.	Ferment. cont.
Alcool éthylique (en degré G. L.)	68,11	67,80	66,20	66,40	64,88	65,05	67,71	67,87	64,91	65,54	64,44	64,6
Alcool méthylique (en mg/l) .	472	304	444	322	564	324	248	216	336	288	504	304
Alcools supérieurs (mg/l) . . .	2 856	1 848	2 250	1 575	1 550	1 148	1 736	1 344	1 700	1 360	1 820	1 560
Acides volatils (mg/l)	182	240	152	200	184	200	150	186	240	266	194	216
Esters totaux (mg/l)	484	536,8	387,2	475,2	369,6	422,4	447,4	482,2	352,0	422,4	316,0	352
Esters œnantiques	24,40	40,20	35,04	57,60	22,40	51,40	40,02	59,20	22,56	32,02	32,40	48,80
Aldéhydes (en mg/l)	111,7	102,9	112,0	75,4	73,2	52,16	141,1	126,4	114,0	97,0	99,8	90,67
Acétals (en mg/l).	36,88	31,15	22,48	21,84	36,0	24,2	20,06	17,22	23,92	16,32	33,1	28,0
Furfural (en mg/l)	2,9	2,65	3,8	2,2	1,25	1,50	2,84	3,05	2,0	2,4	2,4	2,40
Cu (en mg/l).	3,53	4,04	3,81	4,17	5,33	5,82	3,73	4,38	4,56	4,85	5,06	5,32
Fe (en mg/l).	0,23	0,25	0,15	0,29	0,37	0,43	0,30	0,32	0,14	0,16	0,24	0,34
Notes de dégustation (sur 10).	7,86	8,29	8,39	8,44	8,11	8,28	8,04	8,31	8,30	8,40	8,09	8,22

TABLEAU 3

Composition des fractions de « queue »

Constituants	*Dimiat*						*Ugni blanc*					
	Vendange 1971		Vendange 1972		Vendange 1973		Vendange 1971		Vendange 1972		Vendange 1973	
	Ferment. disc.	Ferment. cont.	Ferment. disc.	Ferment. cont.	Ferment. disc.	Ferment. cont.	Ferment. disc.	Ferment. cont.	Ferment. disc.	Ferment. cont.	Ferment. disc.	Ferment. cont.
Alcool éthylique (en degré G. L.)	25,54	25,30	27,76	28,64	25,32	25,83	25,48	25,64	28,86	29,23	27,03	28,04
Alcool méthylique (en mg/l) .	124	96	210	196	240	168	124	120	220	220	160	104
Alcools supérieurs (en mg/l) . .	208	106	168	111	204	105	102	84	140	86	247	132
Acides volatils (en mg/l) . . .	298	360	260	282	272	296	290	294	320	342	275	299
Esters totaux (en mg/l). . . .	164	190,4	176,0	201,2	135,4	155,6	153,4	165,4	140	193	117,6	135,2
Esters œnanthiques (en mg/l) .	18	26	26	32	16,8	30,8	29,6	34,0	16	24	24,6	27,3
Aldéhydes (en mg/l)	34,32	37,28	38,0	35,0	24,2	23,1	31,24	41,36	41,8	38,0	25,3	23,2
Acétals (en mg/l).	12,20	7,25	11,68	8,40	7,2	4,8	10,62	6,60	12,72	9,6	9,6	8,1
Furfural (en mg/l)	3,46	2,98	4,9	3,2	2,9	3,0	3,54	3,4	2,8	2,8	2,8	4,4
Cu (en mg/l).	1,36	2,92	2,81	2,91	2,32	2,54	1,46	2,66	2,11	2,33	4,08	4,42
Fer (en mg/l)	0,19	0,25	0,11	0,14	0,31	0,36	0,12	0,17	0,12	0,12	0,24	0,28

2. — *Alcools supérieurs*

Des études très détaillées ont été réalisées sur les alcools supérieurs des eaux-de-vie de vin par différents auteurs (BOUTHILET et LOWREY, 1959; FLANZY et JOURET, 1963; EGOROV et RODOPOULO, 1964). Ces auteurs signalent deux possibilités d'accumulation des alcools supérieurs dans les eaux-de-vie de vin. Une infime partie des alcools supérieurs des eaux-de-vie provient du raisin; en général, ces alcools supérieurs possèdent un nombre d'atomes de carbone élevé (C_6 — C_9); la quantité principale des alcools supérieurs (C_3 — C_5) est conditionnée par le métabolisme des levures au cours de la fermentation alcoolique. L'influence de la fermentation continue sous pression de CO_2 sur la teneur en alcools supérieurs des eaux-de-vie de vin n'a pas été étudiée. En ce qui concerne l'influence de la fermentation continue classique sur la quantité des alcools supérieurs des vins, FLANZY *et al.* (1968) ont observé une diminution assez sensible. NAVARRO (1975) en étudiant l'influence de la fermentation continue avec des micro-organismes fixés obtient des résultats identiques.

Les tableaux 1, 2, 3 et 4 ainsi que l'histogramme donnent une vue de la fermentation continue sur les quantités d'alcools supérieurs présents dans les différentes fractions. On observe une diminution de la teneur en alcools supérieurs dans les trois fractions d'eaux-de-vie obtenues après distillation des vins vinifiés selon la méthode en continue.

Pour le cépage *Dimiat*, la diminution en poids est la plus forte pour la fraction de « tête » correspondant aux vendanges de 1971 (1 854 mg/l) et pour le cépage *Ugni blanc* au cours des vendanges de 1972 (2 012 mg/l). Lors de la distillation, on note une diminution de plus en plus marquée des teneurs en alcools supérieurs pour les trois vendanges expérimentées avec le cépage *Dimiat*, cette observation se retrouve exclusivement avec le cépage *Ugni blanc* pour la vendange 1973.

3. — *Acides volatils*

Les acides volatils dans les eaux-de-vie de vin proviennent d'une part, des huiles essentielles du raisin, d'autre part des levures et des bactéries du vin. Dans les eaux-de-vie de vin, les acides volatils ont été très étudiés par GROSSFELD et BATTAY cités par SKOURIKHIN (1968), GOGITCHIAITCHVILI (1961), EGOROV et RODOPOULO (1964).

FLANZY et POUX (1968) ont montré au cours de la fermentation en continue de jus de raisin une augmentation importante de la teneur en acides volatils; nous avons obtenu des résultats identiques pour des vins destinés à la distillation (IVANOV, MARINOV, 1976); les auteurs expliquent ce phénomène par le développement de bactéries pendant la fermentation. Nos essais réalisés pendant les vendanges 1971, 1972 et 1973 montrent une augmentation de la teneur en acides volatils pour les différentes fractions des eaux-de-vie de vin.

Sur l'histogramme on observe les teneurs les plus élevées pour les fractions « de cœur » correspondant au cépage *Dimiat* pour les vendanges 1971 et 1972; ce même phénomène se retrouve pour le cépage *Ugni blanc* pour les vendanges 1971.

4. — *Aldéhydes*

La majorité des aldéhydes dans les vins provient de la fermentation. Selon RONKAINEN *et al.* (1962), des quantités importantes d'aldéhydes se forment au cours de la distillation.

L'influence de la fermentation continue sur la teneur en aldéhydes aliphatiques des eaux-de-vie a été étudiée par NATCHEVA et NILOV (1964), ces auteurs observent une diminution des quantités totales d'aldéhydes dans ces eaux-de-vie de vin par rapport aux témoins, les résultats de nos expériences confirment ces données. La teneur en aldéhydes des fractions de « tête » et de « cœur » diminuent pour les différentes vendanges étudiées par rapport au témoin. Pour la fraction de « tête », cette diminution est la plus nette pour la vendange 1972, elle atteint

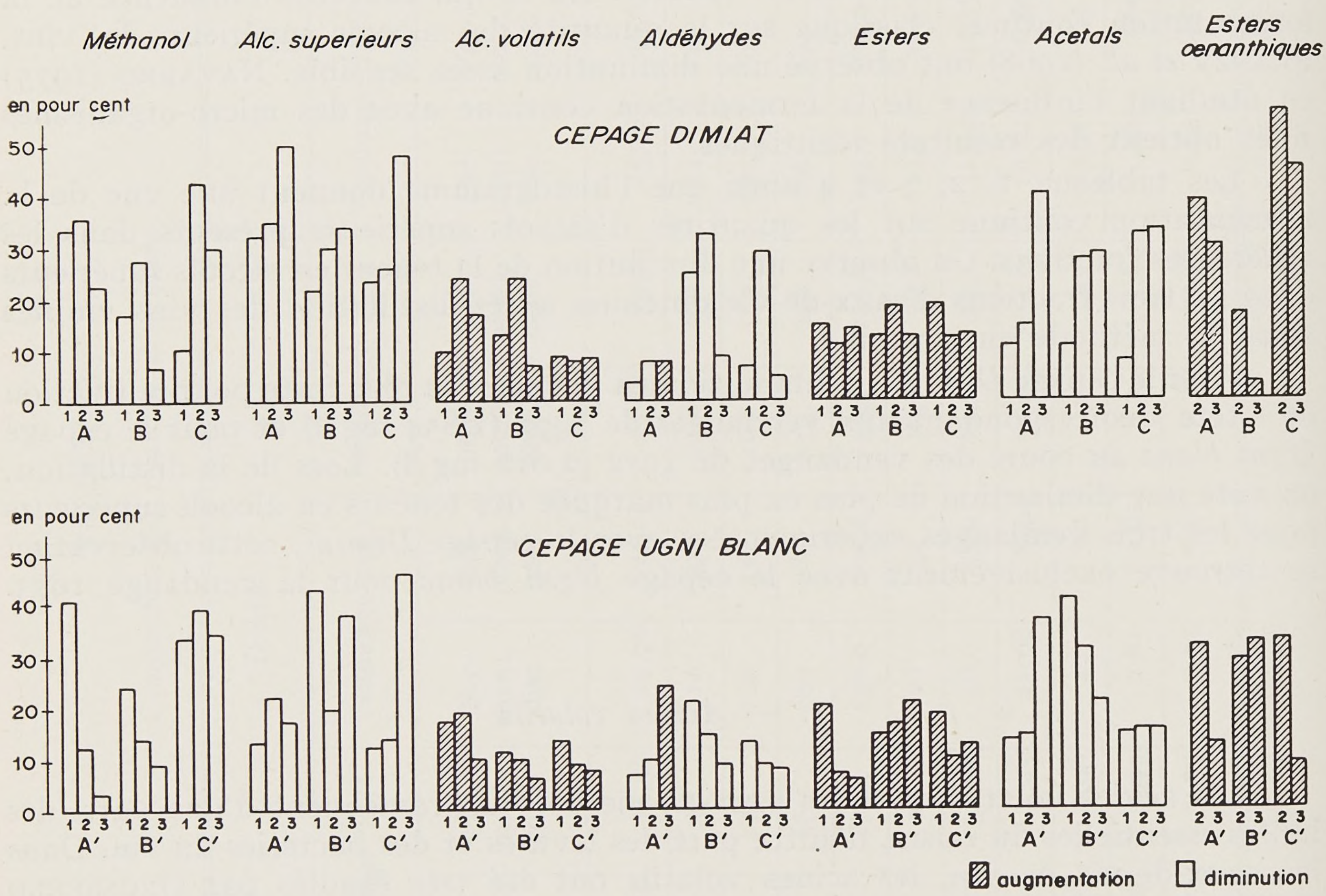


FIG. 1.

144 mg/l pour le cépage *Dimiat* et 133 mg/l pour le cépage *Ugni blanc* (tabl. 4). La diminution la plus forte en aldéhydes pour la fraction de « cœur » correspond aux vendanges de 1972 : 36,6 mg/l pour le cépage *Dimiat* et 17,0 mg/l pour le cépage *Ugni blanc*. La fraction de « queue » présente un accroissement de la teneur en aldéhydes pour la vendange 1971 et une diminution pour les vendanges 1972 et 1973.

5. — *Esters*

Les vins contiennent un grand nombre d'esters provenant soit de la fermentation, soit de la distillation; MARCHE et JOSEPH (1975) signalent la présence au minimum de 124 esters dans le Cognac. Les vins distillés avec leurs lies donnent toujours des eaux-de-vie plus riches en esters que les vins clairs.

TABLEAU 4

Modification pondérale des constituants des différentes fractions par la comparaison de la méthode de vinification sous pression de CO_2 à la méthode classique

Constituants	Vendange 1971			Vendange 1972			Vendange 1973		
	Fraction « tête »	Fraction « cœur »	Fraction « queue »	Fraction « tête »	Fraction « cœur »	Fraction « queue »	Fraction « tête »	Fraction « cœur »	Fraction « queue »
	en poids			en poids			en poids		
Dimiat									
Méthanol (en mg/l)	— 316	— 168	— 28	— 126	— 122	— 14	— 100	— 240	— 72
Alcools supérieurs (en mg/l)	— 1 854	— 1 008	— 102	— 726	— 675	— 57	— 858	— 402	— 99
Acides volatils (en mg/l)	+ 16	+ 58	+ 62	+ 20	+ 48	+ 20	+ 16	+ 16	+ 24
Aldéhydes (en mg/l)	— 18,48	— 8,8	+ 2,97	— 144	— 36,6	— 2,0	— 23,2	— 21,04	— 1,1
Esters (en mg/l)	+ 560,0	+ 52,8	+ 26,4	+ 623	+ 88,0	+ 25,2	+ 1 116,0	+ 52,8	+ 20,2
Acétals (en mg/l)	— 7,85	— 5,73	— 4,95	— 4,40	— 0,64	— 3,28	— 3,60	— 11,8	— 2,4
Esters œnanthiques (en mg/l)	—	+ 15,8	+ 8,0	—	+ 22,56	+ 6,0	—	+ 29,0	+ 14,0
Furfural (en mg/l)	+ 0,9	— 0,25	— 0,48	—	— 1,6	— 1,7	—	+ 0,25	+ 0,1
Notes de dégustation	—	+ 0,43	—	—	+ 0,09	—	—	+ 0,17	—
Ugni blanc									
Méthanol (en mg/l)	— 312	— 32	— 4	— 146	— 48	— 20	— 364	— 200	— 56,0
Alcools supérieurs (en mg/l)	— 464	— 392	— 18	— 2 012	— 340	— 54	— 452	— 260	— 115
Acides volatils (en mg/l)	+ 24	+ 36	+ 14	+ 24	+ 26	+ 22	+ 22	+ 22	+ 24
Aldéhydes (en mg/l)	— 34,3	— 14,7	+ 10,12	— 133	— 17,0	— 3,8	— 48,4	— 9,2	— 2,1
Esters (en mg/l)	+ 1 101,8	+ 34,8	+ 12,0	+ 752	+ 70,4	+ 53,0	+ 1 028	+ 36,0	+ 17,6
Acétals (en mg/l)	— 5,90	— 2,84	— 4,02	— 21,52	— 7,60	— 3,12	— 10,96	— 5,1	— 1,5
Esters œnanthiques (en mg/l)	—	+ 19,2	+ 4,4	—	+ 9,44	+ 8,0	—	+ 16,4	+ 2,6
Furfural (en mg/l)	— 0,25	+ 0,21	— 0,14	—	+ 0,4	0	+ 0,6	0	+ 1,6
Notes de dégustation	—	+ 0,27	—	—	+ 0,10	—	—	+ 0,13	—

Après distillation des vins vinifiés en continu, NATCHEVA et NILOV (1974) observent l'augmentation de la teneur en esters dans ces eaux-de-vie par rapport aux eaux-de-vie provenant de vins témoins. Selon les auteurs cités, avec le cépage *Aligoté* l'augmentation est de l'ordre de 99,6 mg/100 ml d'alcool absolu, avec le cépage *Rkatsitelli* de 15 mg/100 ml d'alcool absolu. Les résultats obtenus montrent une augmentation de la teneur en esters dans les différentes fractions. Dans les fractions de « tête », de « cœur » et de « queue » les teneurs augmentent respectivement de 560-1 116 mg/l, 52,8-88 mg/l et 20,2-26,4 mg/l pour le cépage *Dimiat*; de 752-1 102 mg/l, 36-70,4 mg/l et 12-53 mg/l pour le cépage *Ugni blanc*.

6. — *Acétals*

Les acétals contribuent à donner la nuance douce du bouquet des eaux-de-vie de vin. Selon DJANPOLADYAN (1957) lors de la distillation, une partie des acétals passe dans le distillat, l'autre fraction reste dans les vinasses. En outre selon SKOURIKHIN (1968) pour les alcools, la teneur en acétal est en relation avec le degré alcoolique du distillat et la teneur en aldéhydes. Selon PEYNAUD et MAURIE (1938) pour les distillats à 50° G. L. la teneur en acétal représente 21 p. 100 de la quantité d'aldéhydes. Nous avons observé une diminution de la teneur en acétal de plus en plus prononcée au cours de la distillation des vins, cette remarque est vraie pour les cépages *Dimiat* et *Ugni blanc* exceptée pour ce dernier pour les vendanges 1972.

7. — *Esters œnanthiques*

La notion d'« esters œnanthiques » est diversement appréciée et diffère selon les auteurs. GROSSFELD et MIERMEISTER (cité par SKOURIKHIN, 1968) estiment que la fraction prédominante des esters œnanthiques est représentée par l'ester éthylique de l'acide laurique en mélange avec les esters éthyliques des acides caproïque, caprylique, pelargonique et caprique. DENAUER et BOLEIN (1959) considèrent que le laurate et le pelargonate d'éthyle constituent la fraction principale des esters œnanthiques. SKOURIKHIN (1968) émet l'hypothèse selon laquelle les esters œnanthiques sont des esters éthyliques d'acides gras volatils à haut point d'ébullition.

Selon le travail de MENNESSON et ABRIGEON (1975) les esters œnanthiques sont constitués en majeure partie de caprylate, caprate et laurate d'éthyle.

Les résultats obtenus dans nos essais montrent l'absence totale des esters œnanthiques dans la fraction de « tête », par contre leur teneur augmente dans les fractions de « cœur » et de « queue » pour les eaux-de vie provenant de vins vinifiés en continu sous pression de CO_2. Cette richesse en esters œnanthiques améliore l'arôme des eaux-de-vie jeunes.

8. — *Cuivre et fer*

Les distillats contiennent du fer et du cuivre provenant soit du stockage, soit de la distillation. Les quantités de cuivre et de fer dans les eaux-de-vie sont en relation avec l'acidité volatile des vins et le fonctionnement de l'appareil à distiller.

Les fractions de « cœur » et de « queue » provenant des vins vinifiés en continu contiennent une teneur en cuivre et en fer plus élevée que les témoins.

9. — *Caractéristiques organoleptiques*

Avant vieillissement des différentes fractions de « cœur » les eaux-de-vie de vin jeunes sont appréciées par des dégustateurs. Les notes de dégustation sont présentées dans le tableau 2.

Les eaux-de-vie provenant des vins vinifiés en continu ont toujours obtenu des notes supérieures de 0,10 à 0,43 pour le cépage *Dimiat* et de 0,10 à 0,27 pour le cépage *Ugni blanc* (tabl. 4).

Conclusion

Les vins vinifiés en continu sous pression de CO_2 donnent des eaux-de-vie dont la teneur en alcools supérieurs, aldéhydes, acétals et méthanol est inférieure aux eaux-de-vie vinifiées selon la méthode classique, par contre la teneur en esters, acides volatils et esters œnanthiques augmente ; ces différences chimiques conduisent à des modifications organoleptiques favorables.

Reçu pour publication en octobre 1977.

Summary

Influence of continuous fermentation under CO_2 pressure on wine-spirits composition

Spirits obtained from distillation of wines produced by fermentation under CO_2 pressure, and compared to spirits issued from wines prepared according to the conventionnal method, present noticeable differences about their composition and sensory properties.

An increase of esters and volatil acids content, a decrease of higher alcohols, aldehydes and acetals amounts, improvement of new spirits aroma, are observed.

Références bibliographiques

Bouthilet R., Louwrey M., 1959. *Assoc. Offic. Agric. Chem.*, **42** (3), 634.

Djanpoladyan L., Petrosyan C., 1957. *Travaux scientifiques de l'Institut arménien de la vigne et du vin*, tome III, 173 (en russe).

Denauer E., Bolien H., 1959. *Reichtoffe und Aromen*, Bd 9 (4) (5), 97.

Egorov, Rodopoulo A., 1964. *Travaux scientifiques de l'A.S.U.R.S.S.*, série biologique (4), 613 (en russe).

Flanzy M., Jouret C., 1963. Contribution à l'étude des eaux-de-vie d'Armagnac par chromatographie en phase gazeuse. *Ann. Technol. agric.*, **12**, 1, 39-50.

Flanzy M., Poux C., Dubois P., Dupuy P., 1968. Fermentation du moût de raisin en continu. Formation des alcools supérieurs. *Ann. Technol. Agric.*, **17**, 207-215.

Gogitchaitchvili E., 1961. *Problèmes biochimiques du vin*, Pitchtepromisdat, 120 (en russe).

IVANOV T., MARINOV M., 1976. Influence de la fermentation continue sous pression de CO_2 sur la composition des vins destinés à la distillation. *Ann. Technol. Agric.*, **25**, 3, 239-251.

MALTABAR Y., FERTMAN G., 1971. *Technologie du cognac*, Moscou, 26-32 (en russe).

MENNESSON J., ABRIGEON C., 1975. Huile ou essence de lie appelée parfois « éther œnanthique ». *Ind. Aliment. Agric.*, **6**, 641-644.

MARCHE M., JOSEPH E., 1975. Étude théorique sur le Cognac, sa composition et son vieillissement naturel en fût de chêne. *Rev. fr. Œnol.*, **57**, 1-108.

NATCHEVA T., NILOV V., 1974. Influence de la méthode de fermentation des vins destinés à la distillation sur la qualité des eaux-de-vie. *Industrie du vin*, t. VI, 4 (en russe).

NAVARRO J. M., 1975. *Fermentation en continue à l'aide de micro-organismes fixés*. Thèse Docteur-Ingénieur, présentée à l'Université Paul Sabatier, Toulouse.

RONKAINEN G., SALO P., SUOMALAINEN H., 1962. *Lebensmittel. Unters, und Forch.*, Bd **117**, 4, 281.

SKOURIKHIN I. M., 1968. *Chimie du Cognac*, Moscou (en russe).

Ann. Technol. Agric., 1977, **26** (2), 461-472.

Dosage spectrophotométrique automatique de l'activité *o*-diphénoloxydasique du champignon de Paris *(Agaricus bisporus L.)*

P. VAROQUAUX, J. SARRIS et G. ALBAGNAC (*)

Station de technologie des produits végétaux
Centre de Recherche de Dijon, I.N.R.A.
7, rue Sully, 21034 Dijon Cedex
(*) *Station de technologie alimentaire, I.N.R.A.*,
369, *rue J. Guesde*, 59650 *Villeneuve d'Ascq.*

Résumé

Les auteurs proposent une méthode colorimétrique automatique à flux continu pour mesurer l'évolution de l'activité de l'*o*-diphénoloxydase du champignon de Paris lors de la variation d'une des conditions expérimentales. Ainsi, les influences respectives du pH, de la force ionique du tampon, de la température d'incubation, des concentrations en substrat et en enzyme ont été étudiées.

L'inactivation par excès de substrat semble indiquer la présence sur l'enzyme de deux sites actifs.

Mots-clés : *champignon*, o-*dipéhnoloxydase, dosage automatique.*

I. — Introduction

Les réactions enzymatiques qui se manifestent dans les végétaux après la récolte se traduisent souvent par des altérations de leurs qualités organoleptiques. Ainsi, le brunissement du champignon de Paris débuterait par l'*o*-hydroxylation de la tyrosine et par l'oxydation du produit de réaction la L-Dopa (L-3,4 dihydroxyphénylalanine) en Dopa-quinone. Les stades ultérieurs de l'altération qui conduisent à la formation de Dopa-chrome et des mélanines sont spontanés et très complexes (Dubernet, 1974; Dawson et Tarpley, 1963).

Les deux premières réactions, facteurs limitant du brunissement ultérieur, sont catalysées par un complexe enzymatique, la monophénol, dihydroxyphénylalanine : oxygène oxydoréductase (EC 1.14.18.1) qui possède donc une

activité de monophénol *o*-hydroxylase (crésolase) et une activité d'*o*-diphénol : oxygène oxydoréductase (catécholase). Tous les travaux récents montrent que ce complexe peut être dissocié en groupes enzymatiques ou en sous-unités ne présentant qu'une seule des activités (TANEJA et SACHAR, 1974; MATHEIS et BELITZ, 1975; CONSTANTINIDES et BEDFORD, 1967; BOUCHILLOUX, Mc MAHILL et MASON, 1963; SMITH et KRUEGER, 1962; NAKAMURA, SHO et OGURA, 1966; JOLLEY et MASON, 1965).

Dans la séquence réactionnelle conduisant à la quinone, la deuxième étape, catalysée par la catécholase peut être étudiée indépendamment de la première si l'on fournit au système enzymatique un substrat *o*-diphénolique (MASON, 1957). Inversement, il est toujours difficile d'étudier l'activité crésolasique isolément puisque l'*o*-diphénol, substrat de la catécholase, semble jouer le rôle de co-substrat de l'enzyme (LAVOLLAY, LEGRAND, LEHONGRE, et NEUMANN, 1975; POMERANTZ et WARNER, 1967).

Les nombreuses méthodes employées pour déterminer l'activité catécholasique utilisent les principes suivants : la consommation d'oxygène dans le milieu réactionnel, dans une enceinte étanche (méthodes polarographiques et manométriques), l'apparition des produits quinoniques colorés (méthode spectrophotométrique) et l'oxydation couplée du substrat en présence d'un agent réducteur (méthode chronométrique ou spectrophotométrique U V).

Chaque méthode ne rend compte que d'un aspect différent de la réaction. Ainsi, le nombre d'atomes d'oxygène nécessaires pour oxyder l'*o*-diphénol varie en fonction des conditions expérimentales et du temps d'incubation (DAWSON et TARPLEY, 1963; SCHARF et DAWSON, 1958), ce qui limite considérablement l'intérêt des mesures polarographiques et manométriques. Il faut ajouter que dans cette méthode, la concentration en oxygène (substrat) diminue au cours de la réaction. D'autre part, l'instabilité des quinones colorées modifie l'allure des cinétiques enzymatiques obtenues par les méthodes spectrophotométriques (WAGREICH et NELSON, 1938). L'inactivation irréversible de l'enzyme au cours de cette réaction complique encore le dosage quelle que soit la méthode utilisée (MAYER, HAREL et BEN-SHAUL, 1966). Nous avons retenu pour ce travail la méthode spectrophotométrique directe en présence de pyrocatéchol (substrat de référence), parce qu'elle est facilement automatisable et qu'elle permet donc de suivre directement l'évolution de l'activité enzymatique lorsqu'on fait varier un paramètre du milieu réactionnel.

II. — Matériel et méthodes

2.1. *Préparation de l'extrait enzymatique*

Un lot homogène (500 g) de champignons (variété blanche) au stade « bouton » est paré, lavé, congelé à — 20 °C puis broyé dans un appareil à lames rotatives WORWERK avec 500 ml d'eau distillée contenant 5 g d'acide ascorbique. Cet antioxydant n'est ajouté que pour éviter le brunissement de l'extrait au cours de sa préparation. Après trois broyages d'une minute à vitesse maximale, séparés par une minute de repos le broyat est centrifugé à 4 °C pendant 30 min (1 500 g). Le surnageant est récupéré, saturé en sulfate d'ammonium puis centrifugé dans les mêmes conditions que précédemment. Le culot est remis en solution dans 30 ml de tampon phosphate (pH 6,3-0,1 M). Cet extrait est concentré et partiellement

purifié par dialyse dans une cellule AMICON munie d'une membrane UM 50, plongée dans un bain de glace. L'extrait est lavé trois fois avec 30 ml d'eau distillée. Après la dernière concentration, il est dilué dans 50 ml de tampon phosphate et conservé à — 20 °C jusqu'à son utilisation. Lors de son emploi, cette solution mère est diluée au centième dans le tampon phosphate.

2.2. *Réactifs*

— tampon phosphate : 0,1 M, pH 6,2,
— solution enzymatique : cf. § 2-1,
— substrat : pyrocatéchol 0,8 M dans l'acide sulfurique 0,001 N.

2.3. *Appareillage*

Le dosage automatique comporte essentiellement le mélange des réactants et la mesure continue de la densité optique du milieu réactionnel incubé pendant 2 min 30 s.

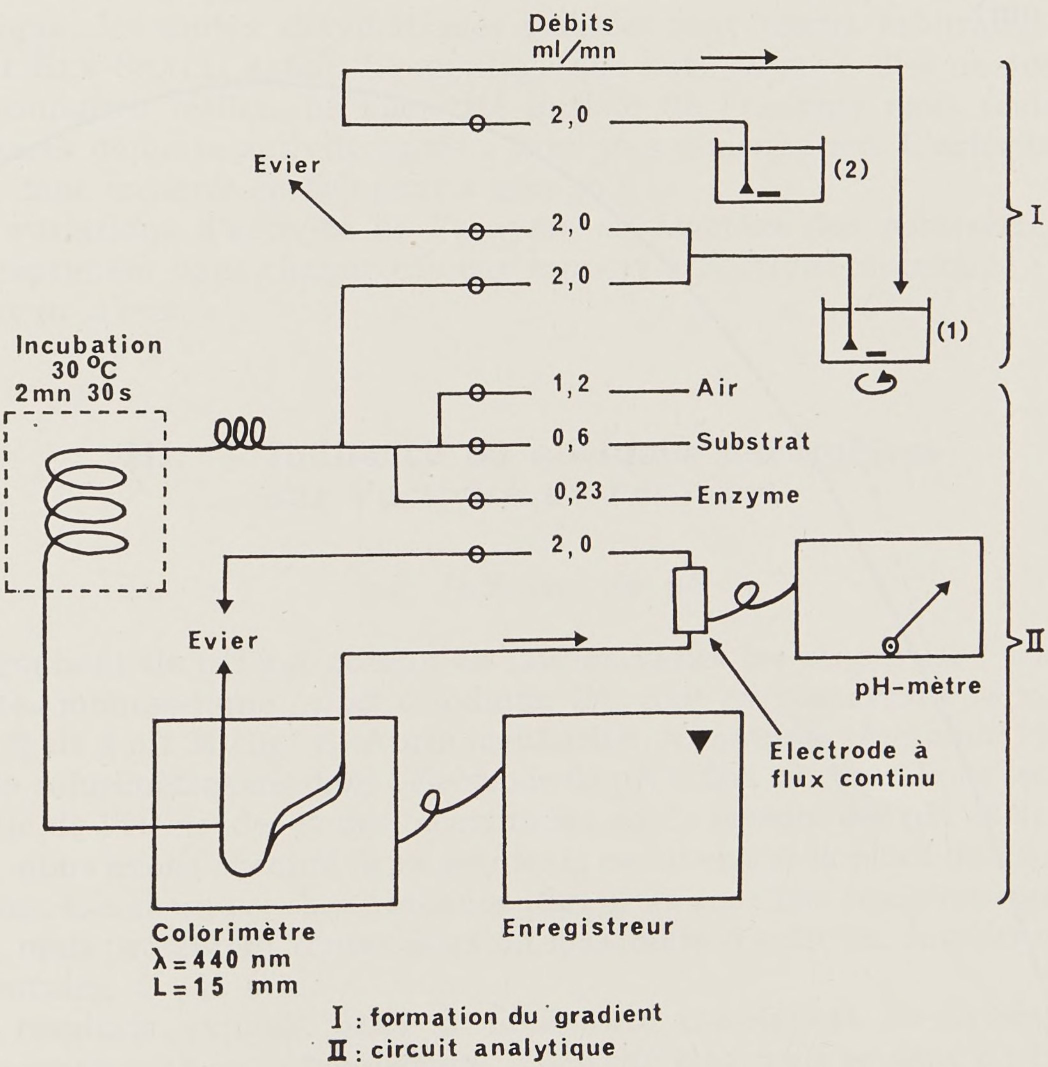


FIG. 1. — *Schéma du montage avec dispositif de formation du gradient.*

Sur cette figure, il s'agit de la formation d'un gradient de pH où $d = 2$ ml/min (1) contient 50 ml du constituant *a* ou *b* du tampon et (2) contient le constituant *b* ou *a* du tampon.

(1) Becher contenant au début de l'expérience un volume V_0 de la solution à la concentration C_0.

(2) Récipient contenant la solution à la concentration finale C du composé étudié.

Le montage, schématisé sur la figure 1, comprend un système de formation de gradient connecté à une chaîne d'analyse en flux continu TECHNICON.

a) *Formation des gradients de concentration.*

Soient C*o* et C, les concentrations initiale et finale du corps dissout. Un gradient linéaire est obtenu entre C*o* et C par le montage suivant : le récipient (1) contenant un volume V*o* de la solution à la concentration C*o* est alimenté par une pompe péristaltique avec la solution (2) de concentration C, avec un débit *d*. Simultanément, la même pompe prélève avec un débit 2*d* le mélange homogénéisé jusqu'à épuisement du contenu de (1). A un instant *t*, la concentration du mélange (C*t*) est donnée par la relation :

$$Ct = Co + \frac{C.d.t}{Vo}$$

Dans la pratique, il est difficile d'obtenir un rapport de débits égal à 2 en raison de la dispersion existant dans les caractéristiques des tuyaux de pompe et

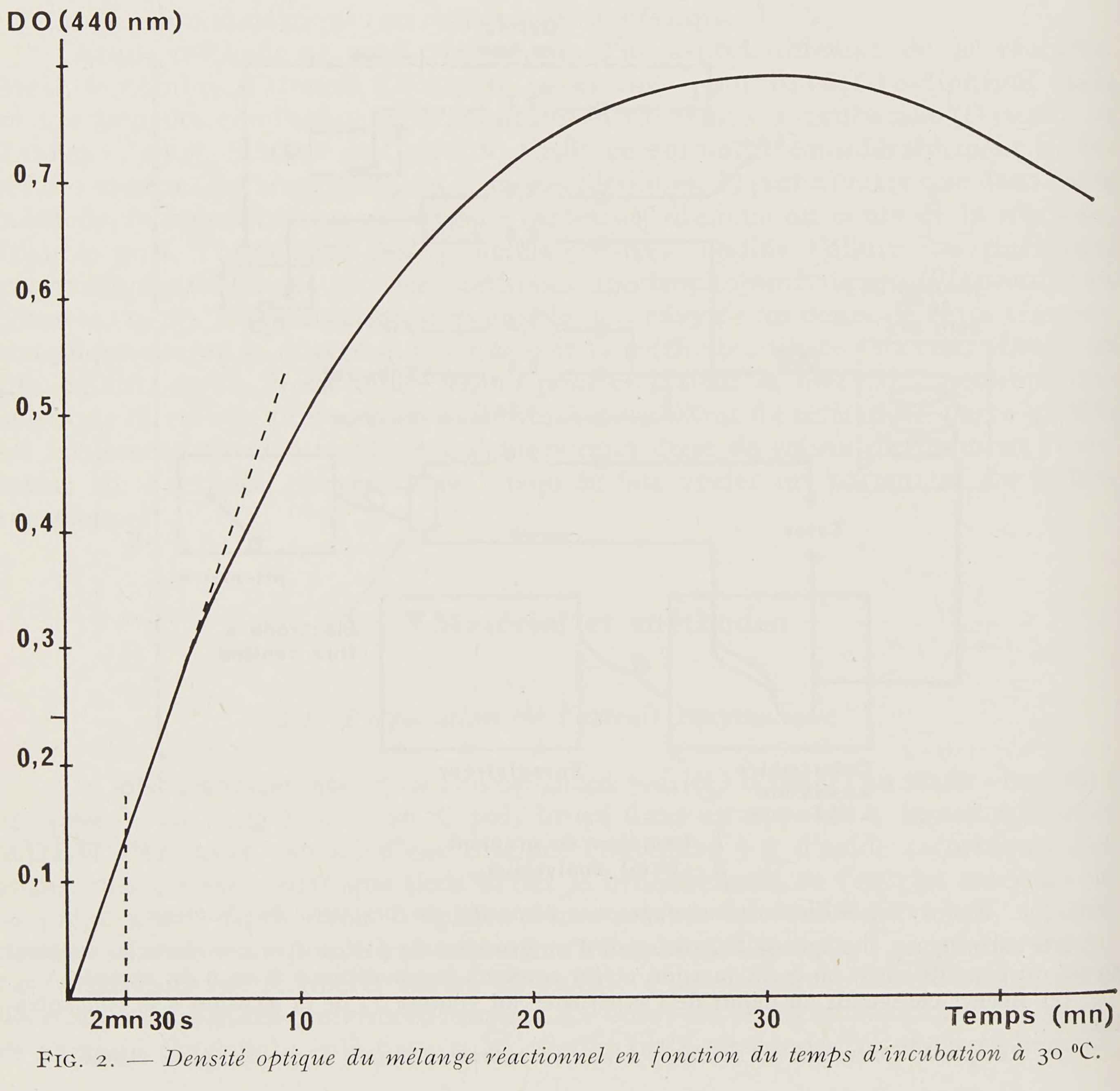


FIG. 2. — *Densité optique du mélange réactionnel en fonction du temps d'incubation à 30 °C.*

de leur usure inégale. Nous avons donc vérifié la linéarité des gradients avec une solution de bichromate de potassium 0,002 M.

b) *Circuit analytique.*

Au cours de la formation du gradient une partie aliquote de l'enzyme, substrat ou constituant du tampon, selon les cas, est prélevée, puis mélangée aux réactants complémentaires. Le flux segmenté par de l'air, est incubé 2 min 30 s dans une bobine thermostatée à 30 °C, et sa densité optique mesurée à 440 nm. En effet, bien que la longueur d'onde d'absorption maximale des quinones se situe vers 400 nm (DUBERNET, 1974), notre appareillage nous a contraint à adopter la longueur d'onde voisine de 440 nm où nous conservons environ 80 p. 100 de la densité optique maximale. La figure 2 montre que dans les conditions où nous nous sommes placés, la vitesse apparente de réaction est d'ordre zéro pendant environ 4 mn.

2.4. *Expression des résultats*

Comme il est impossible de suivre directement la transformation du substrat diphénolique, les unités enzymatiques utilisées sont toutes arbitraires (MAYER, HAREL et BEN-SHAUL, 1966). Le montage que nous avons utilisé ne nous permet pas de connaître réellement l'activité initiale de l'enzyme mais seulement les conséquences de cette activité après 2 min 30 s d'incubation. L'activité enzymatique est donc mesurée en DO pour 2 min 30 s.

Les variations d'activité de l'enzyme en fonction des paramètres étudiés, ont été exprimées dans chaque cas par rapport à l'activité maximale enregistrée pour chacun d'eux.

III. — Influence de quelques paramètres sur l'activité de l'enzyme

3.1. *Influence du pH*

Le gradient de pH est obtenu en faisant varier les proportions relatives des phosphates monosodique (*a*) et disodique (*b*), tout en conservant la molarité du mélange égale à 0,1 M (fig. 1). Après incubation, le mélange réactionnel passe dans la cuve du colorimètre puis dans l'électrode de pH à flux continu. Pour tenir compte de l'inertie de l'électrode, et des incertitudes sur la mesure des pH et des densités optiques, nous avons effectué deux gradients en inversant la place des constituants du tampon. Les deux courbes obtenues (fig. 3) ne sont pas rigoureusement superposables, mais présentent toutes deux un maximum d'activité, dans les conditions expérimentales, à pH 6,2.

Les résultats exposés dans la littérature concernant l'*o*-diphénoloxydase du champignon sont assez homogènes : l'activité maximale se situe à pH 6,5 pour EMBS et MARKAKIS (1965) et à pH 7,0 pour SMITH et KRUEGER (1962) ainsi que pour DALL'AGLIO et CASOLI (1970). Les variations du pH optimum observé sont dues, d'une part à l'influence du protocole opératoire et de la nature du substrat utilisé, et d'autre part, à l'imprécision importante des méthodes manuelles utilisées par ces auteurs.

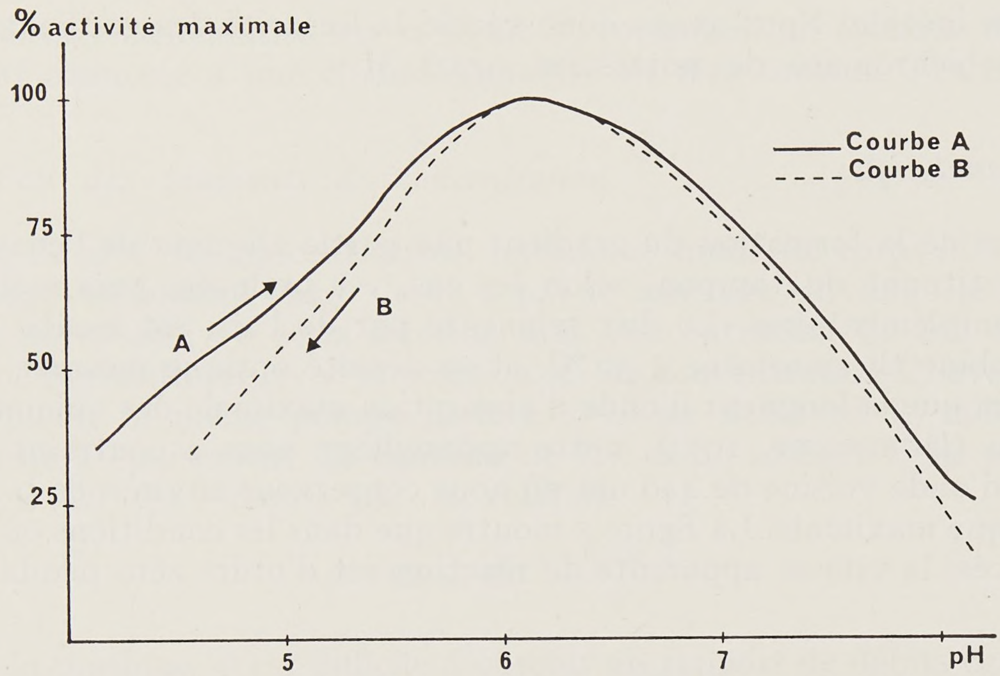


FIG. 3. — *Influence du pH du milieu réactionnel sur l'activité de l'enzyme pour deux gradients inverses A et B.*

3.2. *Influence de la molarité du tampon*

Une augmentation de la molarité du tampon de 0,01 M à 0,35 M est sans effet sur l'activité enzymatique. Ces résultats sont différents de ceux de DALL'AGLIO et CASOLI (1970) utilisant la DOPA comme substrat. La diminution d'activité avec l'augmentation de la molarité, mise en évidence par ces auteurs, peut être imputée à la faible solubilité du substrat qu'ils ont utilisé dans des solutions de force ionique croissante.

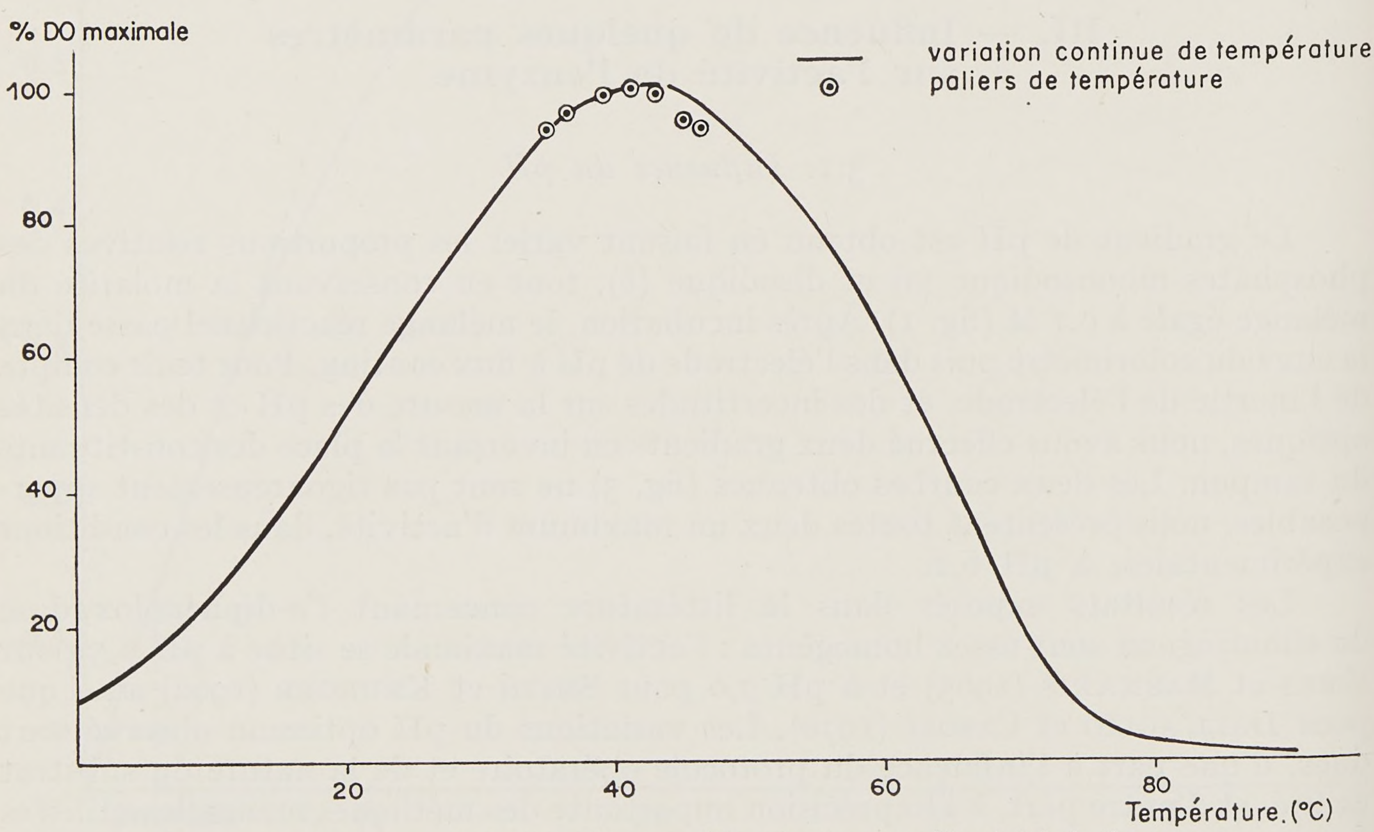


FIG. 4. — *Influence de la température d'incubation sur l'activité de l'enzyme*

3.3. *Influence de la température*

Dans cette expérience, seule la température du mélange réactionnel a varié les autres paramètres étant fixés aux valeurs définies au § 2-3. La température du bain d'incubation augmente linéairement de 0 à 95 °C. Sa valeur est reportée toutes les minutes sur l'enregistrement de la densité optique en fonction du temps. La figure 4 indique que l'activité apparente est maximale à 42 °C. Cette technique comporte une imprécision manifeste car le mélange réactionnel subit un gradient de température pendant l'incubation de 2 min 30 s. Ce gradient reste cependant

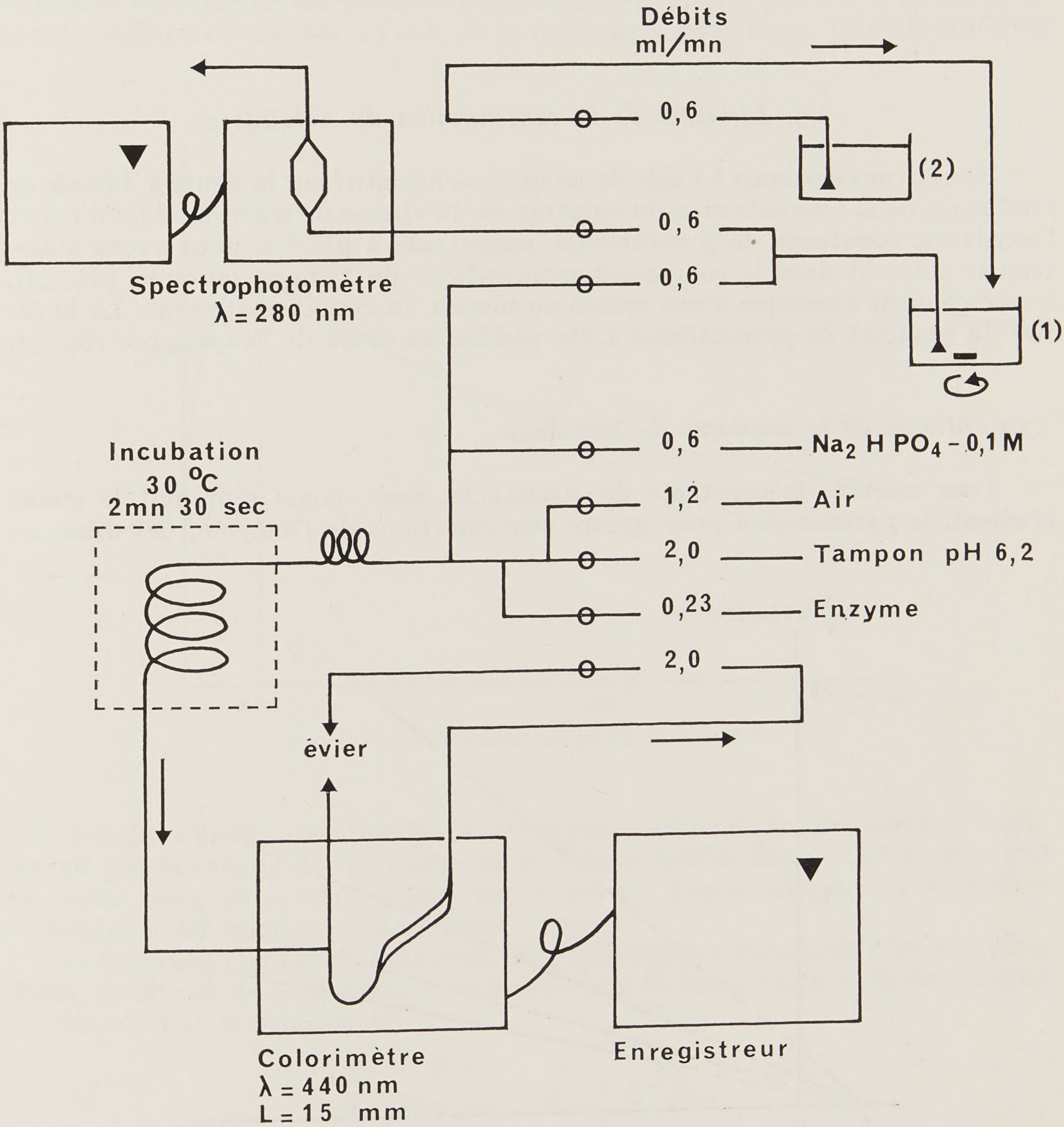


FIG. 5. — *Schéma du montage destiné à l'étude de l'influence de la concentration en pyrocatéchol sur l'activité enzymatique*

(1) 20 ml de NaH_2PO_4.0,1 M.
(2) Substrat. dans $NaH^2 PO^4$.0,1 M.

toujours inférieur à 0,5 °C par minute. En faisant varier la température par paliers entre 36 et 46 °C, il apparaît un maximum à 41 °C (fig. 4). Nous voyons donc que la variation continue de température introduit une erreur maximale de 1 °C.

3.4. *Influence de la concentration de l'enzyme*

En faisant varier linéairement la concentration relative de l'extrait enzymatique dans le mélange réactionnel, on a obtenu une excellente proportionnalité entre l'activité enzymatique et la densité optique mesurée après 2 min 30 s d'incubation. L'erreur maximale mesurable est de 3 p. 100 par rapport au gradient théorique et le coefficient de corrélation entre les deux grandeurs est toujours supérieur à 0,99.

3.5. *Influence de la concentration du substrat*

Nous avons entrepris à l'aide du montage schématisé sur la figure 5, l'étude de l'influence de la concentration du substrat sur la vitesse de réaction. Afin d'éviter l'oxydation spontanée du pyrocatéchol, importante à pH 6,2, nous avons maintenu le substrat dans le composant monosodique du tampon (environ pH 3,5), le complément disodique étant ajouté au niveau du circuit analytique. La linéarité du gradient de pyrocatéchol a été vérifiée au cours de l'expérience (fig. 5).

3.5.1. *Mesure de la constante de Michaelis.*

Pour mesurer la constante de MICHAELIS, nous avons reproduit le même gradient de pyrocatéchol pour quatre concentrations de l'enzyme; des dilutions

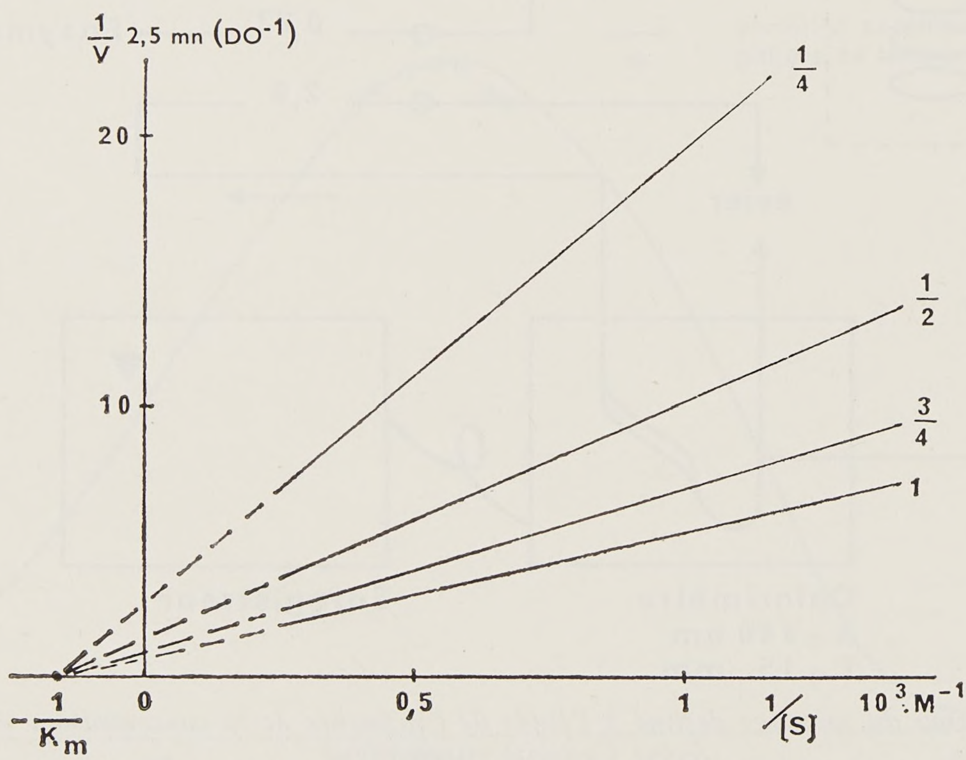


FIG. 6. — *Influence de la concentration en substrat sur l'activité enzymatique. Représentation selon Lineweaver et Burk pour quatre dilutions de l'enzyme.*

de 1/4, 1/2, 3/4, et 1 de l'extrait enzymatique (cf. § 2.1.) ont été utilisées. Les courbes obtenues ont été transposées dans le système de coordonnées de LINEWEAVER et BURK (fig. 6). La constante de MICHAELIS de l'*o*-diphénoloxydase du champignon de couche vis-à-vis du pyrocatéchol à pH 6,2 est : km = 7×10^{-3} M. Cette valeur est compatible avec les résultats de DUCKWORTH et COLEMAN (1970).

3.5.2. *Mesure de la constante d'inhibition par excès de substrat*

L'activité enzymatique, en fonction de la concentration en substrat passe par un maximum (fig. 7). NELSON et DAWSON (1944) ont prouvé que l'incubation anaérobie de l'enzyme en présence pyrocatéchol n'altérait pas son activité. Nous avons confirmé ce résultat à l'aide de la méthode automatique. L'inhibition n'est

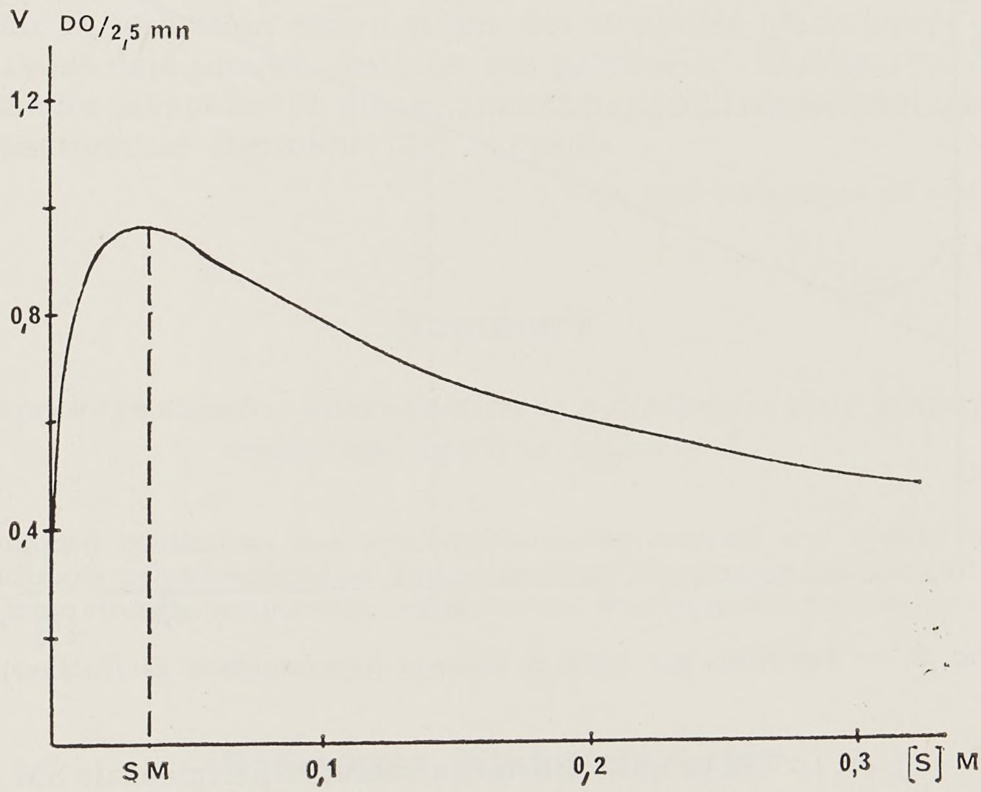


FIG. 7. — *Inhibition par excès de substrat.*

donc pas due à la dénaturation de l'enzyme par le substrat. Ce phénomène, s'expliquerait par la théorie de HALDANE (1930). Les molécules de substrat satureraient au moins deux sites actifs portés par l'enzyme, empêchant ainsi l'orientation nécessaire à la réaction enzymatique.

Si l'on tient compte de l'inactivation par formation réversible d'un complexe (ESS), la vitesse de la réaction V en fonction de la concentration (S) du substrat est donnée par la relation (1) :

$$\frac{1}{V} = \frac{Km}{Vm\ (S)} + \frac{1}{Vm} + \frac{(S)}{Ki\ Vm} \qquad (1)$$

avec V*m*: Vitesse maximale théorique.
K*m* : Constante de MICHAELIS.
K*i* : Constante d'inhibition.

Lorsque la concentration en substrat est élevée, le terme $\frac{Km}{Vm\ (S)}$ devient négligeable et l'expression (1) donne :

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{Vm} + \frac{(S)}{Ki\ Vm.} \qquad (2)$$

K*i* peut être mesurée graphiquement à l'aide de la représentation $1/V = f\ (S)$ (fig. 8). Dans nos conditions expérimentales, on trouve K*i* = 0,2 M.

Il est possible de vérifier la cohérence de ces expériences en calculant la concentration optimale du substrat (SM); en dérivant l'équation (1), on obtient :

$$SM = \sqrt{Ki\,.\,Km} \qquad (3)$$

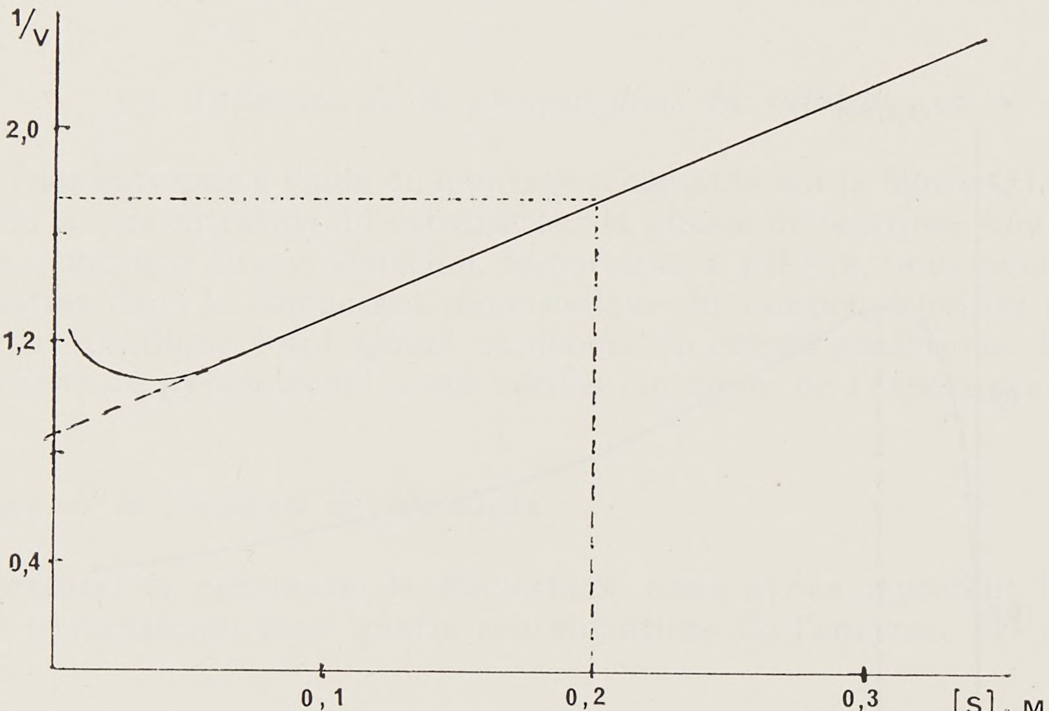


FIG. 8. — *Inhibition par excès de substrat (représentation de Haldane).*

Soit SM = $3{,}46 \cdot 10^{-2}$ M ce qui confirme la valeur expérimentale SM = $3{,}3 \cdot 10^{-2}$ M mesurée sur la figure 7. L'ajustement très précis de l'équation (1) aux courbes expérimentales ne constitue cependant pas une preuve suffisante de l'exactitude du modèle proposé. En effet, l'oxygène, également substrat de l'enzyme semble jouer un rôle actif dans cette inhibition. DUCKWORTH et COLEMAN (1970) ont démontré que l'inhibition par excès de pyrocatéchol de l'*o*-diphénoloxydase du champignon était d'autant plus marquée que la teneur en oxygène dissout dans le milieu réactionnel était faible. L'oxygène semble donc jouer un rôle important dans l'inhibition par excès de substrat. Le modèle proposé (1) ne rend donc compte que d'un aspect très partiel des cinétiques étudiées.

IV. — Conclusion

La méthode proposée présente, par rapport aux techniques manuelles les avantages suivants : reproductibilité des conditions expérimentales, rapidité d'acquisition des résultats et enregistrements continus des phénomènes étudiés.

Cependant, comme pour toutes les méthodes à temps d'incubation fixe, l'interprétation des résultats est difficile, voire impossible lorsque la réaction présente une phase de latence (ce qui se produit par exemple, lorsque l'extrait enzymatique contient un agent réducteur).

Nous avons étudié l'influence de différents paramètres sur la réponse du circuit analytique et nous avons pu dégager les conditions optimales pour la suite de notre étude. En outre, nous avons précisé et modélisé l'effet inhibiteur sur l'enzyme d'un excès de substrat. Il est possible d'expliquer partiellement le modèle proposé en supposant l'existence sur l'enzyme d'au moins deux sites actifs et la formation d'un composé transitoire au cours de la formation des quinones. La formation d'intermédiaires au cours de l'oxydation enzymatique du pyrocatéchol a été prouvée par de nombreux auteurs (KERTESZ et ZITO, 1962; INGRAHAM, 1956).

Cette technique doit nous permettre d'étudier de manière rigoureuse l'influence sur l'activité enzymatique des principaux facteurs physicochimiques utilisés pour prévenir la formation enzymatique des composés quinoniques colorés. En effet, nous avons déjà prouvé, dans un cas particulier (VAROQUAUX *et al.*, 1975) que les méthodes manuelles de dosage étaient particulièrement mal adaptées pour mesurer l'inactivation thermique des enzymes.

Reçu pour publication en octobre 1977.

Summary

Automated spectrophotometric determination of o-*diphenoloxidase activity in common mushroom / Agaricus bisporus L.*

An automated continuous flow spectrophotometric method was applied to the kinetic studies of mushroom polyphenoloxidase during linear modifications of reaction medium. Effects of pH, buffer ionic strengh, temperature, substrate and enzyme concentrations were investigated.

Références bibliographiques

BOUCHILLOUX S., Mc MAHILL P., et MASON H. S., 1963. The multiple forms of mushroom tyrosinase. Purification and molecular properties of the enzymes. *J. Biol. Chem.*, **238** (5), 1699-1707.

CONSTANTINIDES S. M., BEDFORD C. L., 1967. Multiple forms of phenoloxidase. *J. Food Sci.*, **32**, 446-450.

DALL'AGLIO G., CASOLI U., 1970. La polifenoloxidasi dei funghi *Agaricus bisporus*. *Ind. Conserve* (Parma), **45**, 131-133.

DAWSON C. R., TARPLEY W. B., 1963. On the pathway of the catechol-tyrosinase reaction. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **100**, 937-950.

DUBERNET M., 1974. Recherches sur la tyrosine de *Vitis vinifera* et la laccase de *Botrytis cinerea* : Applications technologiques. Thèse de doctorat, Université de Bordeaux.

DUCKWORTH H. W., COLEMAN J. E., 1970. Physicochemical and kinetic properties of mushroom tyrosinase. *J. Biol. Chem.*, **245** (7), 1613-1625.

EMBS R. J., MARKAKIS P., 1965. The mechanism of sulfite inhibition of browning caused by polyphenoloxidase. *J. Food. Sci.*, **30**, 753-758.

HALDANE J. B. S., 1930. *The enzymes*. Longmans, Green and Co, London.

INGRAHAM L. L., 1956. Effect of ascorbic acid on polyphenoloxidase. *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 5095-5097.

JOLLEY R. L., MASON H. S., 1965. The multiple forms of mushroom tyrosinase-Interconversion. *J. Biol. Chem.*, **240**, 1489-1491.

KERTESZ D., ZITO R., 1962. Phenolase. In HAYAISHI O., Oxygenases, Chap. 8, Academic Press, New-York.

LAVOLLAY J., LEGRAND G., LEHONGRE G., NEUMAN J., 1975. Sur l'ortho-hydroxylation du *p*-crésol par les tyrosinases en présence d'acide ascorbique. *Physiol. Veg.*, **13** (3), 667-676.

MASON H. S., 1957. Mechanisms of oxygen metabolism. *Adv. Enzymol.*, **19**, 79-233.

MATHEIS G., BELITZ H. D., 1975. Multiple forms of soluble monophenol dihydroxyphenylalanine: oxygen oxidoreductase E.C. 1.14.18.1 from potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Z. Lebensm. Unter Forsh.*, **157**, 221-227.

MAYER A. M., HAREL E., BEN-SHAUL R., 1966. Assay of catechol oxidase. A critical comparison of methods. *Phytochem.*, **5**, 783-789.

NAKAMURA T., SHO S., OGURA Y., 1966. On the purification and properties of mushroom tyrosinase. *J. Biochem.* (Tokyo), **59**, 481-486.

NELSON J. M., DAWSON C. R., 1944. Tyrosinase. *Adv. Enzymol.*, **4**, 99-152.

POMERANTZ S. H., WARNER M. C., 1967. 3,4-Dihydroxyphenylalanine as the tyrosinase confactor. *J. Biol. Chem.*, **242**, 5308-5314.

SCHARF W., DAWSON C. R., 1958. The effect of ascorbic acid on the inactivation of tyrosinase. *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 4627-4631.

SMITH J. L., KRUEGER R. C., 1962. Separation and purification of the phenolases of common mushroom. *J. Biol. Chem.*, **237** (4), 1121-1128.

TANEJA S. R., SACHAR R. C., 1974. Separate monophenolase and *o*-diphenolases enzymes in *Triticum aestivum*. *Phytochem.*, **13**, 1367-1371.

VAROQUAUX P., CLOCHARD A., SARRIS J., AVISSE Cl., MORFAUX J. N., 1975. Détermination automatique de l'inactivation thermique et de la régénération des enzymes. Application à la peroxydase du pois (*Pisum sativum L.*). *Lebensm. Wiss. u-Technol.*, **8**, 60-63.

WAGREICH H., NELSON J. M., 1938. On the mechanism of catechol-tyrosinase reaction. *J. Am. Chem. Soc.*, **60**, 1545-1548.

Ann. Technol. Agr., 1977, **26** (4), 473-486.

Action des antioxydants et de la chaleur sur l'*o*-diphénoloxydase du champignon de Paris *(Agaricus bisporus L.)*

P. VAROQUAUX, J. SARRIS et G. ALBAGNAC (*)

Station de technologie des produits végétaux, INRA,
7, rue Sully, 21034 Dijon Cedex
(*) *Station de technologie alimentaire, I.N.R.A.*
369, rue J. Guesde, 59650 Villeneuve d'Ascq.

Résumé

A l'aide d'une méthode colorimétrique à flux continu, les auteurs ont étudié d'une part l'action du sulfite et de l'acide ascorbique sur l'*o*-diphénoloxydase du champignon de Paris, et d'autre part, l'influence du chauffage sur l'activité de cette enzyme.

L'acide ascorbique empêche la formation des produits colorés mais n'affecte pas directement la stabilité de l'enzyme alors que le sulfite réduit les *o*-quinones et simultanément inactive l'enzyme.

Lors du chauffage, l'enzyme présente une phase d'activation avant de s'inactiver irréversiblement. Ces phénomènes ont été étudiés et modélisés.

MOTS CLÉS : *champignon,* o-*diphénoloxydase, antioxydants, traitement thermique.*

1. — Introduction

Le champignon de Paris est sujet à un brunissement rapide au cours de sa conservation et de sa transformation industrielle. Cette altération met en jeu un substrat phénolique (dans le champignon, la DOPA qui se forme par *o*-hydroxylation de la tyrosine), l'oxygène et une enzyme : l'*o*-diphénoloxydase.

En général, la prévention du brunissement des fruits et légumes peut être obtenue par trois méthodes principales (PHILIPPON, 1971). La première consiste à choisir ou à créer des variétés ne renfermant pas les substrats des enzymes. Cette méthode est inapplicable dans le cas du champignon puisque le précurseur de la DOPA est la tyrosine, constituant indispensable de ses protéines. La deuxième a pour objet de détruire ou d'inactiver les enzymes catalysant les réactions

chimiques. Cette inhibition peut être obtenue par la chaleur ou par voie chimique (sulfite). Enfin, il est possible soit de limiter l'apport d'oxygène, soit de réduire les composés d'oxydation au fur et à mesure de leur formation (utilisation d'acide ascorbique et de sulfite). A l'aide de la méthode automatique d'étude précédemment décrite (VAROQUAUX, SARRIS et ALBAGNAC, 1977), nous avons recherché l'effet de ces différents procédés sur l'activité de l'*o*-diphénoloxydase du champignon de couche.

2. — Matériel et méthode

2.1. *Réactifs*

La préparation de l'extrait enzymatique a été décrite précédemment : VAROQUAUX, SARRIS et ALBAGNAC (1977).

— Pyrocatéchol recristallisé 2 fois dans du benzène — 0,8 M dans une solution d'acide sulfurique 10^{-3} N.

— Tampon phosphate 0,1 M à différents pH dont pH 6,2.

— Acide ascorbique 2,83 m M dans du tampon phosphate 0,1 M, pH 6,2.

— Sulfite de sodium 0,426 m M dans du tampon phosphate 0,1 M, pH 6,2.

2.2. *Montages automatiques et protocoles expérimentaux*

Le dispositif d'analyse est constitué d'une chaîne TECHNICON à flux continu comprenant une pompe péristaltique qui effectue le mélange réactionnel, une bobine d'incubation thermostatée à 30 °C et un colorimètre muni de filtres à 440 nm et d'une cuve à circulation de 1,5 cm de trajet optique.

a) *L'effet des réducteurs sur l'activité enzymatique.*

Pour simplifier le montage, un seul tuyau a été utilisé pour alimenter le circuit analytique en substrat et en réducteur. Comme le montre la figure 1, le gradient n'a porté que sur la concentration en sulfite ou en acide ascorbique, la concentration du substrat restant constante. Les concentrations en sulfite et en acide ascorbique ont varié linéairement de 0 à respectivement 3.10^{-4} et 2.10^{-3} M dans le flux.

b) *Effet de la préincubation de l'enzyme dans des solutions réductrices à 30 °C.*

La solution enzymatique (40 ml) et le tampon phosphate pH 6,2 (20 ml) sont versés dans un bécher thermostaté à 30 °C. Lorsque l'équilibre thermique est atteint on ajoute 4 ml d'une solution d'acide ascorbique ou de sulfite. Une partie aliquote de ce mélange est prélevée en continu et alimente le circuit analytique dans lequel s'effectue l'addition de tampon et de substrat.

c) *Traitement thermique de l'extrait enzymatique.*

Le montage automatique permettant d'inactiver les enzymes et de mesurer en continu l'activité résiduelle proposée par VAROQUAUX *et al.* (1975) a été utilisé.

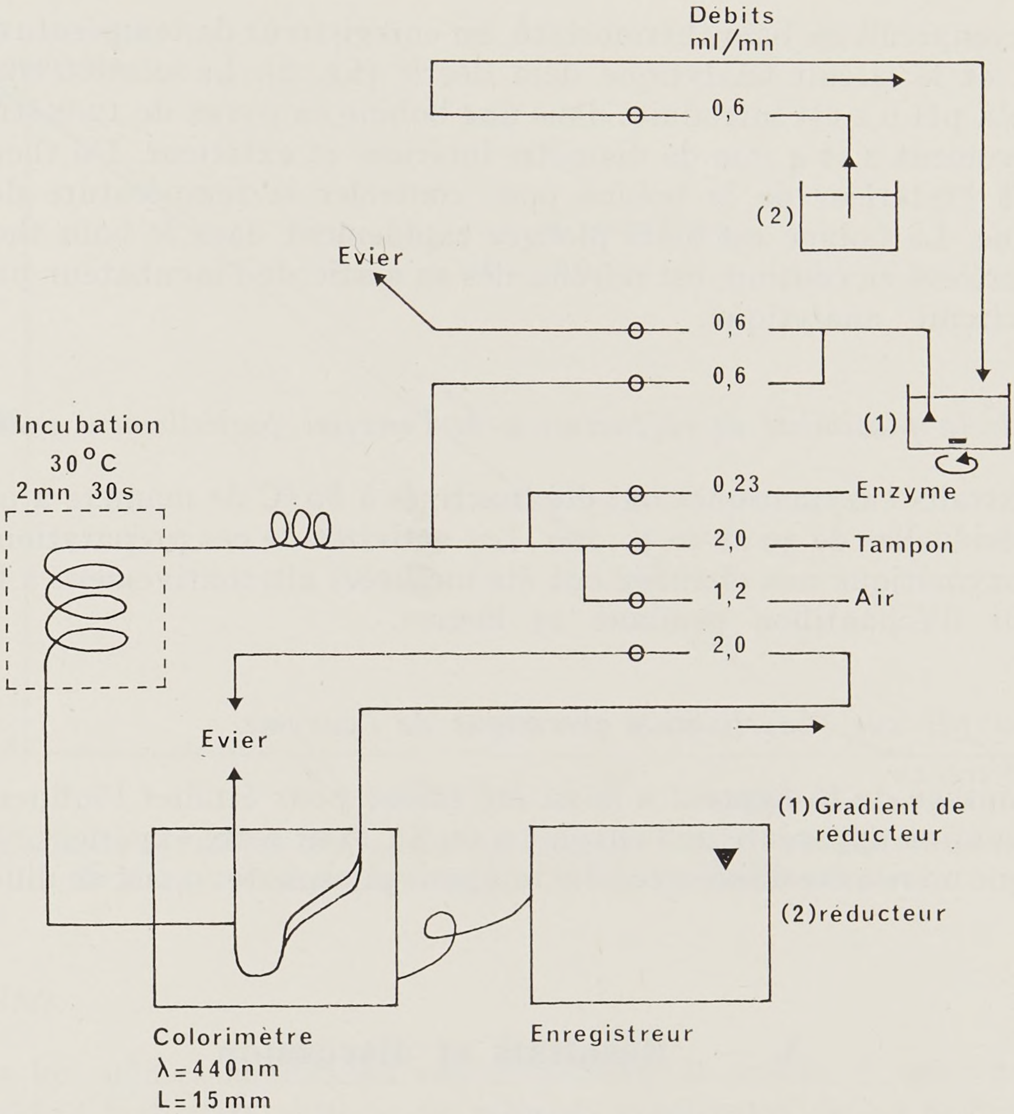


FIG. 1. — *Schéma du montage réalisé pour l'étude de l'influence des réducteurs sur l'activité de l'enzyme.*

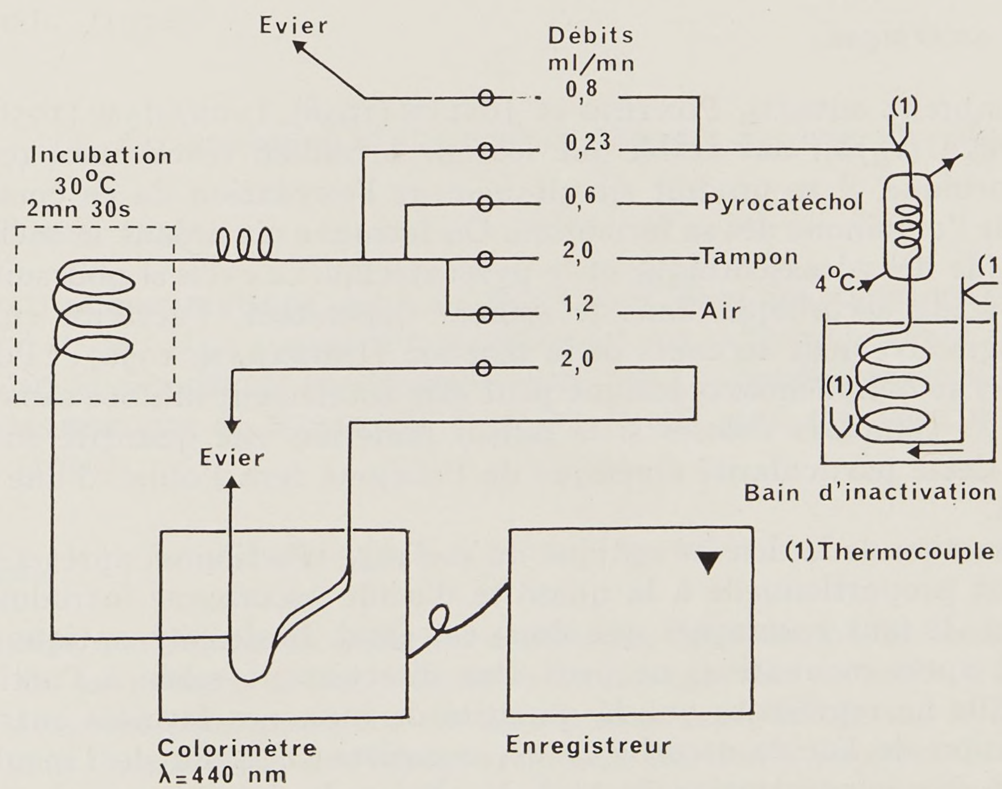


FIG. 2. — *Schéma du montage réalisé pour l'étude de l'inactivation thermique de l'enzyme.*

Le circuit comprend un bain thermostaté, un enregistreur de température, un bain réfrigérant et le circuit analytique déjà décrit (fig. 2). La solution enzymatique tamponnée à pH 6,2 est introduite dans une bobine en pyrex de 12 mètres de long et respectivement 2 et 4 mm de diamètre intérieur et extérieur. Un thermocouple est glissé à l'intérieur de la bobine pour contrôler la température de l'extrait enzymatique. La bobine est alors plongée rapidement dans le bain thermostaté. Le milieu prélevé en continu, est refroidi dès sa sortie de l'incubateur puis envoyé dans le circuit analytique.

d) *Étude de la possibilité de régénération de l'enzyme partiellement inactive.*

Des extraits enzymatiques ont été inactivés à 80 °C de manière à obtenir des activités résiduelles de 30 et 10 p. 100. Les activités de ces préparations et d'une solution enzymatique non chauffée ont été mesurées alternativement à l'aide d'un distributeur d'échantillon pendant 15 heures.

e) *Effet du pH sur l'inactivation thermique de l'enzyme.*

Le montage de la figure 2 a aussi été utilisé pour étudier l'influence du pH sur l'inactivation apparente de l'enzyme à 60 °C. Pour cette expérience la solution enzymatique mère a été diluée avec des tampons phosphates 0,1 M de différents pH.

3. — Résultats et discussion

3.1. *Effet des réducteurs sur l'activité enzymatique*

a) *L'acide ascorbique.*

De nombreux auteurs, Ponting et Joslyn (1948), Ingraham (1956), Ulrich et Delaporte (1970), ont établi que lorsque le milieu réactionnel renferme de l'acide ascorbique, il se produit simultanément l'oxydation de ce composé et la réduction de l'*o*-quinone dès sa formation. On retrouve ainsi dans le mélange réactionnel l'acide déhydroascorbique et le pyrocatéchol. Ce cycle se poursuit tant qu'il reste de l'acide ascorbique dans le milieu. Cependant, l'activité enzymatique décroît progressivement au cours de la réaction (Ingraham, 1956; et Poux, 1966.) Ainsi, l'activité *o*-diphénoloxydasique peut être totalement inhibée sans qu'il y ait apparition de composés colorés si le milieu renferme une quantité suffisante de réducteur. Cette particularité cinétique de l'enzyme fera l'objet d'une prochaine publication.

La réduction de la densité optique du mélange réactionnel après 2,5 min d'incubation est proportionnelle à la quantité d'acide ascorbique introduite dans le flux (fig. 3). Il faut remarquer que dans cet essai, la densité optique du milieu réactionnel après incubation, ne peut être directement reliée à l'activité enzymatique. Elle ne représente que la quantité de quinones formées entre l'instant où l'oxydation de l'acide ascorbique est complète et la fin de l'incubation. Ce réducteur à, une concentration de 10^{-3}. M, abaisse la densité optique du mélange réactionnel (à 440 nm et pour 1,5 cm de trajet optique) d'environ 2 unités.

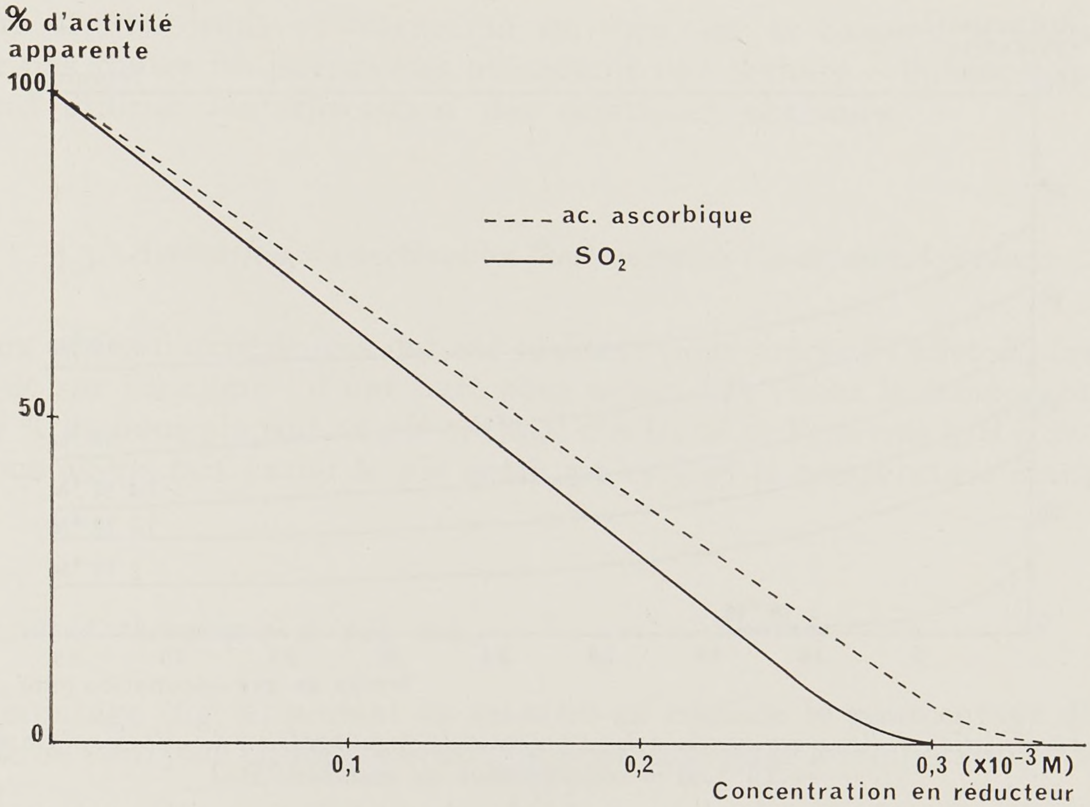


FIG. 3. — *Évolution de l'activité enzymatique apparente en fonction de la concentration du réducteur. La valeur* 100 p. 100 *correspond à la DO maximale sans réducteur.*

b) *Le sulfite.*

Dans les mêmes conditions expérimentales, le sulfite, à une concentration 10^{-3}. M, réduit la densité optique du mélange réactionnel de 2,4 unités. Le sulfite agirait d'une part comme un réducteur et se fixerait d'autre part sur les quinones pour donner un complexe stable et incolore, EMBS et MARKAKIS (1965), LUH et PHITHAKPOL (1972).

3.2. *Préincubation de l'enzyme en présence de composés réducteurs*

a) *L'acide ascorbique.*

Un extrait enzymatique mis à incuber à 30 °C dans des solutions d'acide ascorbique (10^{-2} et 10^{-3} M) a conservé intégralement son activité pendant plus de deux heures. L'acide ascorbique ne dénature donc pas l'*o*-diphénoloxydase. Ce résultat confirme les travaux de SCHARF et DAWSON (1958) ainsi que ceux de MARKAKIS et EMBS (1966).

b) *Le sulfite.*

Le sulfite contrairement à l'acide ascorbique dénature partiellement l'enzyme au cours de la préincubation précédant le dosage. Les courbes d'inactivation obtenues avec six concentrations de sulfite sont reproduites sur la figure 4. La chute de la D.O. au début des enregistrements, est due à l'apport de sulfite dans le mélange réactionnel lors du prélèvement de l'enzyme. Ces cinétiques sont voisines de celles rapportées par EMBS et MARKAKIS (1965). En outre, comme l'ont

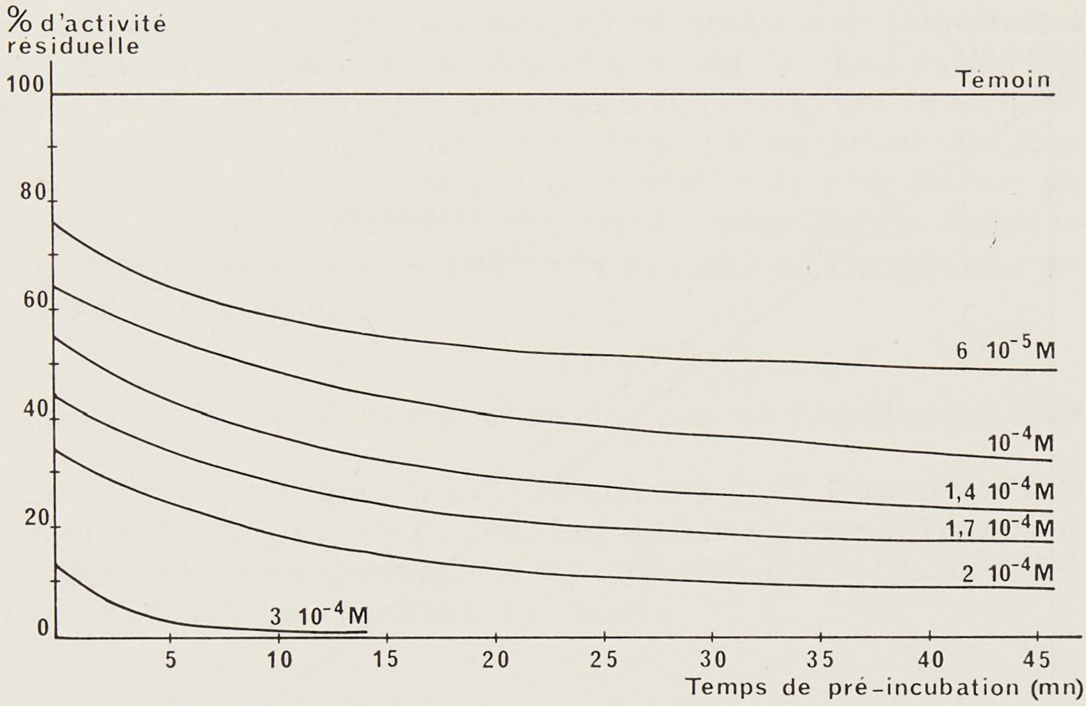


FIG. 4. — *Inactivation de l'enzyme au cours de sa préincubation en présence de métabisulfite de sodium.* (——— 10^{-4}.M = *concentration de métabisulfite.*)

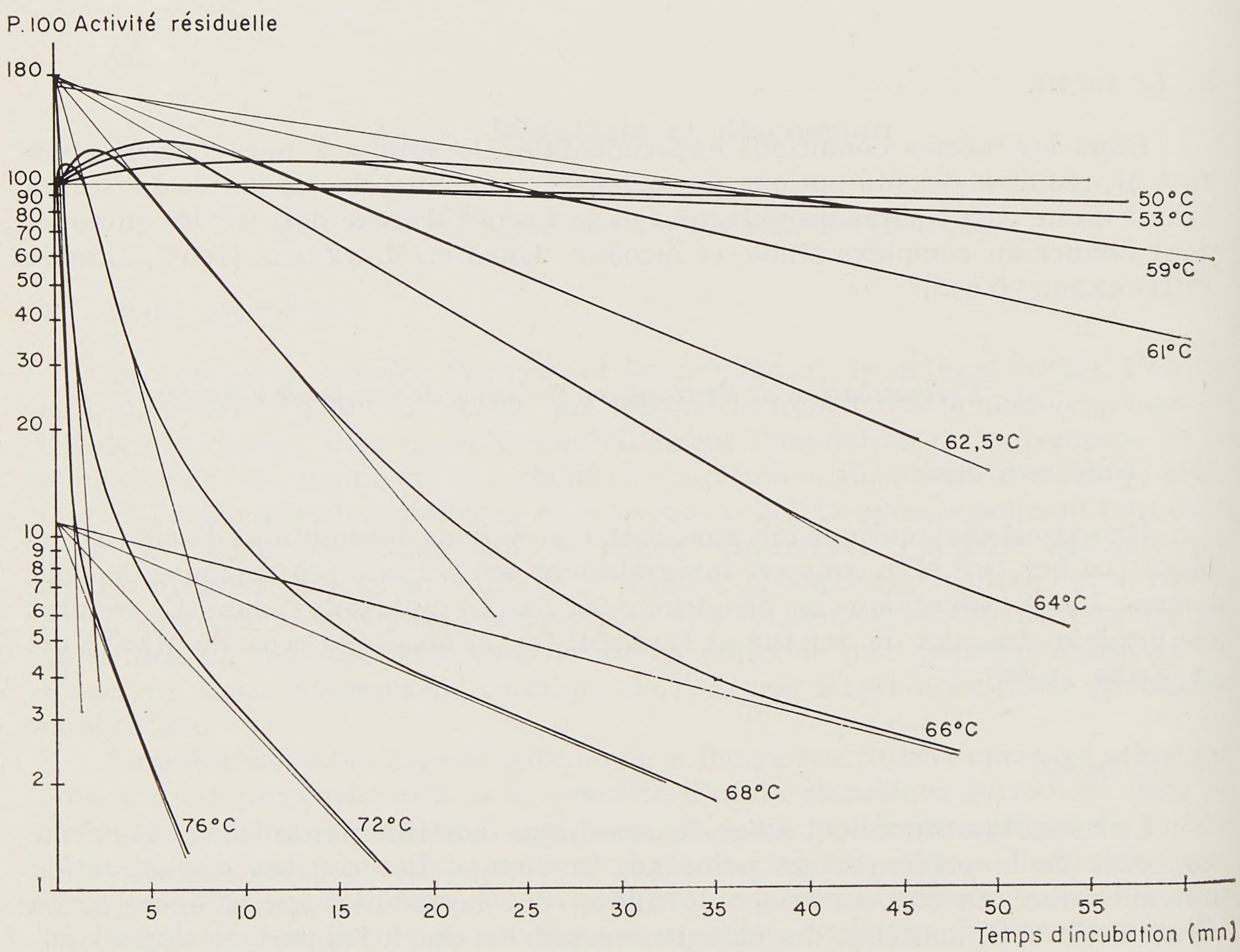


FIG. 5. — *Évolution de l'activité o-diphénoloxydasique au cours du traitement thermique à diverses températures.*

démontré MONTGOMERY et SCARBIERI en 1974, sur la banane, le métabisulfite n'inhibe pas toutes les isoenzymes présentant une activité *o*-diphénoloxydasique. Ceci rend difficile l'interprétation des cinétiques obtenues.

3.3. *Activation et inactivation thermiques de l'*o*-diphénoloxydase*

Deux séries d'expériences ont été réalisées pour préciser l'effet du traitement thermique sur l'enzyme : d'une part nous avons fait varier la température entre 50 et 80 °C en nous plaçant au pH optimal d'activité de l'enzyme (pH 6,2). D'autre part, nous avons fait varier le pH entre 3,5 et 7,75 la température étant fixée à 60 °C.

a) *Traitement thermique à pH* 6,2.

Le montage (fig. 2) permet de mesurer en continu le pourcentage d'activité résiduelle de l'enzyme en fonction du temps de chauffage à température constante. Le pourcentage d'activité résiduelle $\left(\frac{E}{E_0}\right)$ p. 100 est calculé selon l'expression suivante :

$$\left(\frac{E}{E_0}\right) \text{ p. } 100 = \frac{DO_t - DO_f}{DO_0 - DO_f} \times 100$$

$\left(\frac{E}{E_0}\right)$ p. 100 = pourcentage d'activité résiduelle.
DO_t densité optique du mélange réactionnel au temps *t*.
DO_0 = densité optique du mélange réactionnel : enzyme non chauffée.
DO_f = densité optique du mélange réactionnel : enzyme blanchie.

La figure 5 montre l'évolution de l'activité enzymatique en fonction du temps de chauffage à diverses températures. Ces courbes présentent 3 parties :

— activation,
— inactivation rapide,
— inactivation lente de l'enzyme.

Les deux premières parties des enregistrements peuvent être étudiées simultanément et être ajustées à un modèle mathématique alors que la troisième, compte-tenu de sa faible importance relative et de la mauvaise précision des courbes en fin d'inactivation, ne peut faire l'objet que d'hypothèses.

L'une des propriétés des *o*-diphénoloxydases et spécialement de celle du champignon de Paris est de s'activer pendant la première phase de certains traitements thermiques. Les travaux de YAMAGUCHI, HWANG et CAMPBELL (1970) ont prouvé l'existence dans le champignon de couche d'une forme latente de cette enzyme qui est activable par divers procédés physicochimiques.

Nous postulerons que la forme latente se transforme en enzyme active selon une cinétique du premier ordre. Nous supposerons également que les formes initialement actives ou activées sont une même enzyme thermolabile (A) :

$$L \xrightarrow{K_1} A \xrightarrow{K_2} I \qquad \text{(hypothèse 1)}$$

avec L enzyme latente (concentration initiale L_0).
A enzyme active (concentration initiale A_0).
I enzyme inactivée.
K1 coefficient d'activation de L.
K2 coefficient d'inactivation de A.

Signalons que la forme latente (L) pourrait être l'association de l'enzyme active (A) et d'un inhibiteur de nature protéique. Cette hypothèse avancée par Yoshida, Tanaka et Nakayama (1974), expliquerait la conversion de la forme latente en forme active et reste donc compatible avec le modèle proposé.

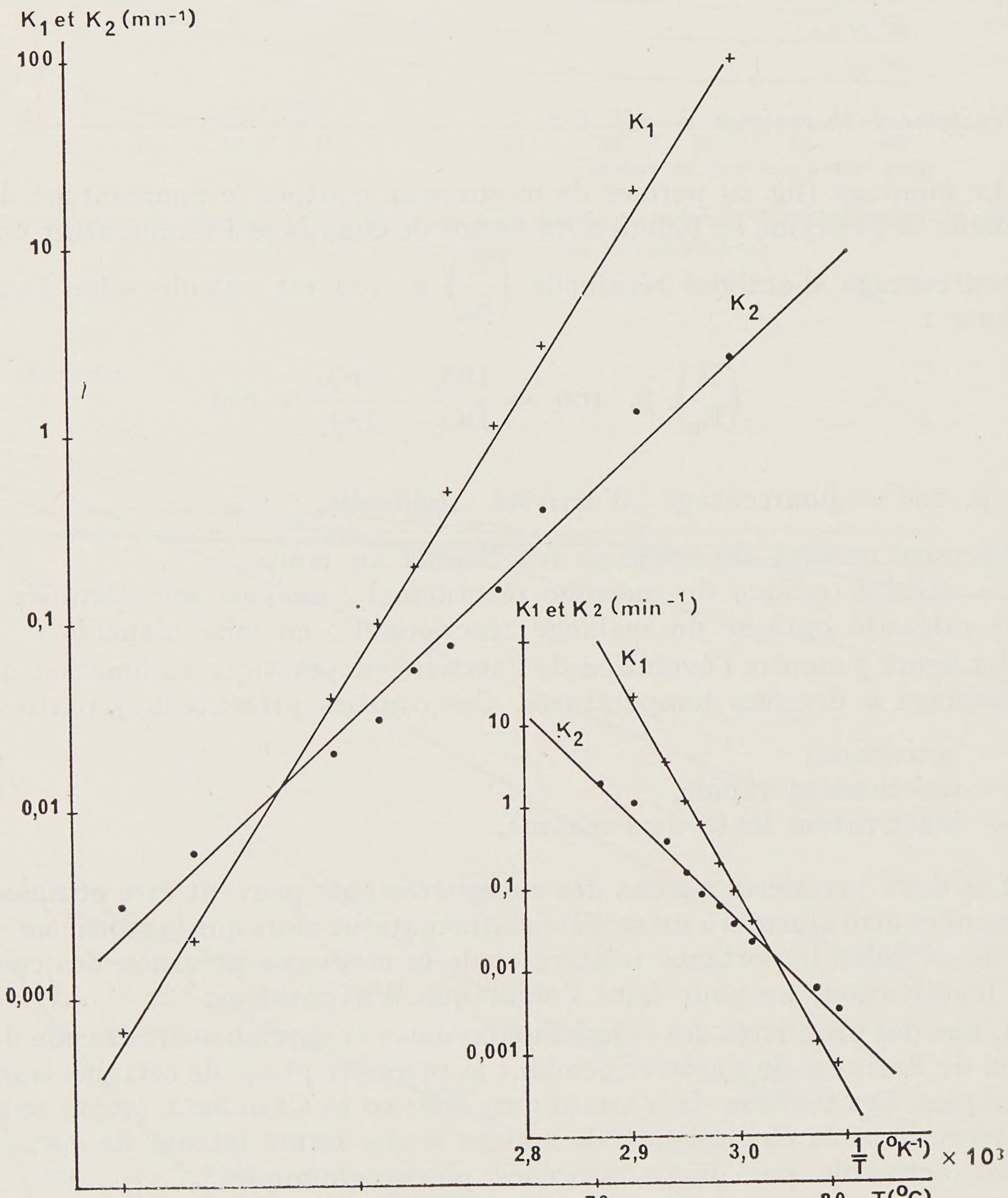


Fig. 6. — *Variation des coefficients d'activation et d'inactivation de l'o-diphénoloxydase en fonction de la température*

(+) K1 coefficient d'activation.
(.) K2 coefficient d'inactivation.

L'expression mathématique découlant de ce modèle peut s'écrire :

$$\left(\frac{E}{E_0}\right) \text{p. } 100 = 100\, e^{-K2t} + 100\, \frac{L_0}{A_0} \cdot \frac{K1}{K2 - K1}\left(e^{-K1t} - e^{-K2t}\right)$$

Le faisceau des asymptotes des courbes obtenues à haute température coupe l'axe des ordonnées au point $100 + 100\,\frac{L_0}{A_0}$. Comme le montre la figure 5 ce point correspond à une activation maximale de 85 p. 100 de l'activité initiale A_0. Il faut alors supposer qu'à température élevée (> 60 °C) la valeur du coefficient K2 est nettement inférieure à celle de K1 — (voir fig. 6).

L'expression donnant l'activité résiduelle de l'enzyme devient alors :

$$\left(\frac{E}{E_0}\right) \text{p. } 100 = 100\, e^{-K2t} + 85\, \frac{K1}{K2 - K1}\left(e^{-K1t} - e^{-K2t}\right)$$

Pour ajuster le modèle aux courbes expérimentales les coefficients K1 et K2 ont été calculés par approximations successives. Les valeurs obtenues dépendent de la température selon une loi exponentielle représentée sur la figure 6. Les variations de ces coefficients suivent, aux erreurs d'expérience près, la loi d'Arrhénius. Au-dessous d'une température de 56 °C, K2 devient supérieur à K1, l'activité mesurée ne peut plus théoriquement dépasser l'activité initiale (100 p. cent). Les courbes expérimentales montrent qu'effectivement ce phénomène se produit entre 53 et 59 °C.

DEMEAUX et BIDAN (1967) mesurant l'inactivation thermique de la polyphénoloxydase de raisin ont constaté un changement de pente vers 60 °C sur les courbes d'activité résiduelle en fonction de la température de chauffage. Ce qui confirme les travaux de DIMICK, PONTING et MAKOWER (1950). Ces résultats peuvent s'expliquer par la présence d'une forme enzymatique latente dans les extraits utilisés par ces auteurs. En effet, l'activation de cette forme latente aux basses températures peut diminuer considérablement la vitesse apparente de l'inactivation thermique de l'enzyme, seul paramètre accessible expérimentalement. L'inertie du montage utilisé atténue les brusques variations de densité optique du flux. Il en résulte une déformation du début des enregistrements obtenus à température élevée. Compte tenu de cette restriction, l'expression mathématique du modèle s'ajuste correctement aux courbes expérimentales (tabl. 1).

La phase d'inactivation lente de l'enzyme en fin de traitement thermique a été également observée par PADRÓN, LOZANO et GONZÁLES (1975) sur *o*-diphénoloxydase de banane. La partie de la courbe expérimentale correspondant à ce phénomène peut être dans un système de coordonnées semilogarithmiques, assimilée à une droite, ce qui traduit une cinétique de dénaturation du premier ordre. La fin des enregistrements obtenus n'est jamais suffisamment précise pour faire l'objet d'une modélisation, mais il est possible de retenir plusieurs hypothèses pour expliquer l'allure de la courbe.

L'enzyme activée n'aurait ni la même stabilité thermique, ni la même activité spécifique que la forme active initiale :

$$L \xrightarrow{K1} B \xrightarrow{K2} I$$

$$A \xrightarrow{K2} I$$

L = Enzyme Latente
B = Enzyme Activée
A = Enzyme Active
I = Enzyme Inactivée

(hypothèse 2)

TABLEAU I

Inactivation de l'o-diphénoloxydase
Ajustement des valeurs calculées aux points expérimentaux

0° C	50		53		59		61		62,5		64		66		68		72		76	
t	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1															115	127,8	50	52	16	15,4
2													120	136	85	88,8	(13)	14,2	(1,8)	1,3
3													115	122	54	59,6	(3)	3,9		
4													100	107,7	35	40				
5	99	98,8	98	97,9	105	105,1	110	117	124	121,8	125	129,2	88	93,3	28	26,8				
6											120	122,2	75	80,9	21	18				
7											115	115,3	64	69,7						
8											110	107,9	54	59,7						
9											100	100	47	51,4						
10	98	97,6	96,5	95,8	107	107,1	115	119,4	113	109	94	93,8	41	44,3						
15	96	96,5	94	93,8	108	107,7	110	114,1	88	89,1	65	64,9	20	20,9						
20	94	95,3	92,5	91,8	106	104,6	105	105,1	68	69,9	46	44,6								
25	93	94,2	91	89,9	101	101,2	94	94,6	52	53,9	33	30,7								
30	92	93,1	89	88	98	97	82	84	41	41,2	23	21,1								
35	91	92	87	86,2	94	92,2	70	73,8	31	31,4	15	14,5								
40	91	90,9	85	84,5	88	87	62	64	25	25	10	10								
45	90	89,8	83	82,7	80	81,7	54	56,1	19,5	20										
50	88	88,8	81	81	74	76,3	47	48,6												
55	86,5	87,7	78	79,4	67	71	42	43												
60	86	86,7	76	77,8	63	65,9	36	36,3												

E = Valeurs expérimentales.
A = Valeurs calculées.
() = Valeurs expérimentales extrapolées.

Selon cette hypothèse l'enzyme passerait successivement par plusieurs stades avant d'être inactivée.

L'activité initiale (E_0) est, comme l'ont démontré Fox et Burnett (1962), la somme des activités de plusieurs isoenzymes présentant des coefficients d'inactivation thermique différents. Les segments de courbe traduisant cette destruction lente de l'activité *o*-diphénoloxydasique devraient avoir, quelle que soit la température du traitement, une même ordonnée à l'origine représentant le pourcentage d'activité initiale due à la forme résistante de l'enzyme (Clochard et Guern, 1973). Cette condition de convergence semble être réalisée sur les quatre enregistrements exploitables (fig. 5). L'activité initiale de l'isoenzyme la plus thermorésistante serait de 11 p. 100, mais cette valeur dépend des conditions d'extraction de l'enzyme.

Il faut signaler que ces hypothèses ne s'excluent pas mutuellement et que l'on peut envisager toutes les combinaisons de ces phénomènes. Des modèles très complexes faisant intervenir plusieurs isoenzymes passant successivement par plusieurs formes font cependant apparaître un grand nombre de coefficients et de paramètres inaccessibles expérimentalement. Ces diverses hypothèses ont déjà été étudiées sur l'*o*-diphénoloxydase de *Neurospora crassa* par Fox et Burnett (1962). Nous nous sommes volontairement limités au calcul du modèle le plus simple permettant une interprétation logique des phénomènes enregistrés.

Signalons, en outre, que l'enzyme partiellement inactivée ne se regénère pas après le traitement thermique contrairement aux peroxydases (Varoquaux *et al.*, 1975; Mihályi et Vamos-Vigyázó, 1975) et à la phosphatase alcaline (Ngog-cu, Lenoir et Veisseyre, 1964).

b) *Influence du pH sur l'inactivation apparente de l'enzyme à 60 °C.*

Le montage de la figure 3 a été également utilisé pour étudier l'influence du pH sur l'inactivation de l'enzyme à 60 °C. Sur la figure 7 sont reportés les coefficients d'inactivation apparents (K2 app) obtenus à différents pH de préincubation, à 60 °C. L'optimum de stabilité thermique de l'enzyme se situe entre pH 6 et pH 6,5. Cette zone correspond exactement au maximum d'activité de l'enzyme. Dimick, Ponting et Makower (1950), ont trouvé pour la polyphénoloxydase de poire une stabilité thermique maximale à un pH voisin de celui que nous avons obtenu.

La stabilité de l'enzyme est maximale à des pH voisins de la neutralité. Ce fait a déjà été observé sur des polyphénoloxydases d'origine différente et avec divers substrats par Dimick, Ponting et Makower (1950). Jankov (1962) ainsi que par Demeaux et Bidan (1966 et 1967).

c) *Application technologique au blanchiment du champignon.*

Pour calculer les barèmes de blanchiment, il faut tenir compte d'une part de la diffusion thermique et d'autre part, de la thermorésistance de l'enzyme à inactiver. Des champignons entiers calibrés (diamètre du carpophore 24 mm) ont été plongés dans de l'eau bouillante. L'élévation de température au centre thermique de l'échantillon en fonction du temps de chauffage est représenté sur la figure 8. Pour obtenir 80 °C à cœur il est nécessaire de maintenir les champignons au moins 6 min à 100 °C. Il faut remarquer que des barèmes insuffisants peuvent entraîner une activation de l'*o*-diphénoloxydase au centre du champignon et provoquer des altérations de la couleur.



FIG. 7. — *Temps de réduction décimale (D) et coefficient de vitesse apparente (K app) d'inactivation de l'enzyme pour divers pH à 60 °C.*

4. — Conclusion

Nous avons contribué à préciser le mode d'action des différents procédés destinés à prévenir la formation des quinones par l'*o*-diphénoloxydase du champignon.

Les composés réducteurs agissent différemment selon leur nature. Ainsi, l'acide ascorbique réduit les *o*-quinones formées sans inhiber l'activité de l'enzyme. Le sulfite, par contre, inactive partiellement l'*o*-diphénoloxydase et réduit simultanément les produits de la réaction. Ces constatations expliquent l'effet du sulfite, utilisé dans la pratique pour éviter le brunissement du champignon, combinant l'effet réducteur et l'inactivation irréversible de l'enzyme.

Sur un autre plan, les cinétiques enzymatiques réalisées en présence d'acide ascorbique apportent des informations indispensables à l'interprétation du mode d'action de l'enzyme qui sera l'objet de la troisième partie de ce travail.

Le traitement thermique provoque trois réactions simultanées : activation d'une forme latente, inactivations rapide et lente de l'enzyme. Selon les hypothèses 1 et 2, cette forme latente représente une fois totalement activée 85 p. 100 de l'activité *o*-diphénoloxydasique initiale de nos extraits. Cette proportion est nette-

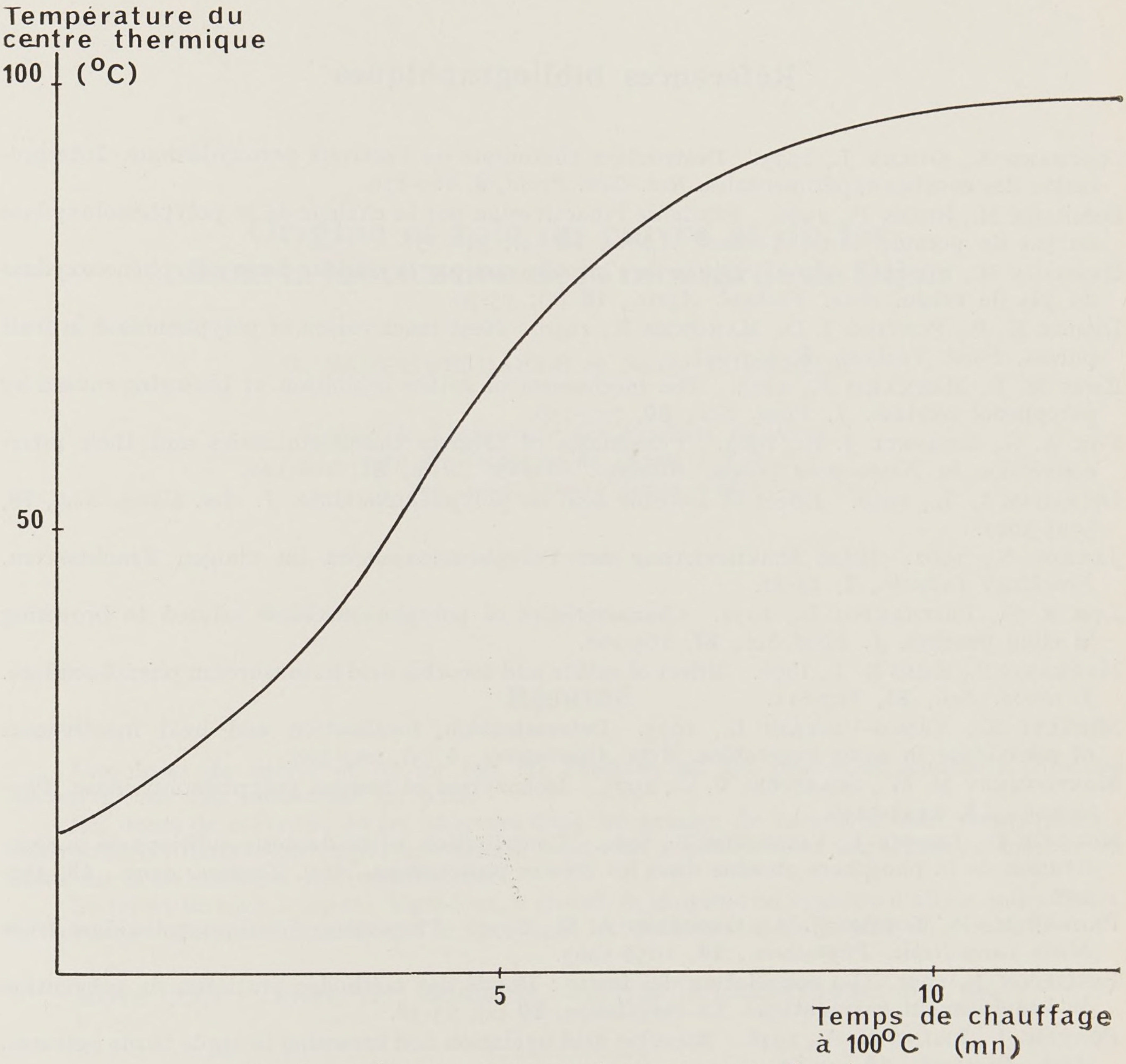


FIG. 8. — *Élévation de la température au centre thermique d'un champignon calibré (24 mm de diamètre) plongé dans l'eau bouillante.*

ment plus élevée *in situ* et elle dépend de la méthode de préparation de l'enzyme. Pratiquement le niveau peu élevé du coefficient de transfert thermique du champignon et le phénomène d'activation de l'*o*-diphénoloxydase imposent des couples temps-température de blanchiment élevés (6 à 15 min à 95 °C).

Reçu pour publication en octobre 1977.

Summary

Effect of antioxydants and heat on common mushroom o-*diphenoloxydase.* (*Agaricus bisporus L.*)

The effect of sulfite and ascorbic on the reaction of common mushroom *o*-diphenoloxidase with catechol was studied with an improved continuous flow colorimetric method. It was found that both ascorbic acid and sulfite prevented the discoloration. During enzyme preincubation with sulfite a gradual loss of activity was observed.

Enzyme thermal activation and inactivation were studied and a pattern described. The curve fitting calculation was attempted.

Références bibliographiques

CLOCHARD A., GUERN J., 1973. Destruction thermique de l'activité peroxydasique. Interprétation des courbes expérimentales. *Rev. Gén. Froid*, **8**, 860-870.

DEMEAUX M., BIDAN P., 1966. Étude de l'inactivation par la chaleur de la polyphénoloxydase du jus de pomme. *Ann. Technol. Agric.*, **15** (4), 349-358.

DEMEAUX M., BIDAN P., 1967. Étude de l'inactivation par la chaleur de la polyphénoloxydase du jus de raisin. *Ann. Technol. Agric.*, **16** (2), 75-79.

DIMICK K. P., PONTING J. D., MAKOWER B., 1950. Heat inactivation of polyphenolase in fruit purees. *Food. Technol.*, **5**, 237-241.

EMBS R. J., MARKAKIS P., 1965. The mechanism of sulfite inhibition of browning caused by polyphenol oxidase. *J. Food. Sci.*, **30**, 753-758.

FOX A. S., BURNETT J. B., 1962. Tyrosinases of diverses thermostabilities and their interconversion in *Neurospora crassa*. *Biochim. Biophys. Acta*, **61**, 108-120.

INGRAHAM L. L., 1956. Effect of ascorbic acid on polyphenoloxidase. *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 5095-5097.

JANKOV S., 1962. Hitze Inaktievierung der Polyphenoloxydasen im einigen Fruchtsäften. *Fruchtsaft Industr.*, **7**, 13-32.

LUH B. S., PHITHAKPOL B., 1972. Characteristics of polyphenoloxidase related to browning in cling peaches. *J. Food Sci.*, **37**, 264-268.

MARKAKIS P., EMBS R. J., 1966. Effect of sulfite and ascorbic acid in mushroom phenol oxidase. *J. Food. Sci.*, **31**, 807-811.

MIHÁLYI K., VÁMOS-VIGYÁZO L., 1975. Determination, localization and heat inactivation of peroxidase in some vegetables. *Acta Alimentaria*, **4** (3), 291-308.

MONTGOMERY M. W., SCARBIERI V. C., 1975. Isoenzymes of banana polyphenol-oxidase. *Phytochem.*, **14**, 1245-1249.

NGOC-CU D., LENOIR J., VEISSEYRE T., 1964. Contribution à l'étude des conditions de la réactivation de la phosphate alcaline dans les crèmes pasteurisées. *Ann. Technol. agric.*, **13**, 377-397.

PADRÓN M. P., LOZANO J. A., GONZÁLES A. G., 1975. Properties of *o*-diphenoloxidase from *Musa cavendishii*. *Phytochem.*, **14**, 1959-1963.

PHILIPPON J., 1971. La congélation des fruits : Revue des méthodes pratiques de prévention du brunissement enzymatique. *La surgélation*, **80** (2), 23-38.

PONTING J., JOSLYN M. A., 1948. Ascorbic acid oxidation and browning in apple tissue extracts. *Arch. Biochem.*, **19**, 47-63.

POUX C., 1966. Polyphénoloxydase dans le raisin. *Ann. Technol. agric.*, **15** (2), 149-158.

SCHARF W., DAWSON C. R., 1958. The effect of ascorbic acid on the inactivation of tyrosinase. *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 4627-4631.

ULRICH R., DELAPORTE N., 1970. L'acide ascorbique dans les fruits conservés par le froid dans l'air et en atmosphère contrôlée. *Ann. Nutr. Alim.*, **24** (3), 287-325.

VAROQUAUX P., CLOCHARD A., SARRIS J., AVISSE Cl., MORFAUX J. N., 1975. Détermination automatique de l'inactivation thermique et de la régénération des enzymes. *Lebensm. Wiss. u. Technol.*, **8**, 60-63.

VAROQUAUX P., SARRIS J., ALBAGNAC G., 1977. Dosage spectrophotométrique automatique de l'activité *o*-diphénoloxydasique du champignon de Paris (*Agaricus bisporus L.*) *Ann. Technol. agric.* **26** (4), 461-472.

YAMAGUHI M., HWANG P. M., CAMPBELL J. D., 1970. Latent *o*-diphenoloxidase in mushroom (*Agaricus bisporus*). *Canad. J. Biochem.*, **48** (2), 198-202.

YOSHIDA H., TANAKA Y., NAKAYAMA, 1974. Properties of Tyrosinase from Pseudomonas melanogenum. *Agr. Biol. Chem.*, **38** (3), 627-632.

Ann. Technol. Agric., 1977, **26** (4), 487-498.

Origine et rôle du cuivre et du fer dans la fabrication de la moutarde de Dijon

G. VANGHEESDAELE et Nicole FOURNIER

Station de Technologie des Produits Végétaux,
Centre de Recherche de Dijon, I.N.R.A.
7, rue Sully, 21034 Dijon Cedex

Résumé

Des doses de cuivre et de fer ont été effectués sur des graines de moutarde (*Brassica juncea*) et sur des moutardes en pâte.

Les doses de cuivre et de fer trouvées dans les graines de moutarde sont comparables à celles existant dans d'autres plantes mais il existe un enrichissement important en métaux au cours de la fabrication des condiments.

Le fer et surtout le cuivre dégradent, à chaud, la sinigrine en cyanure d'allyle, par ailleurs, ils oxydent l'acide sulfureux ajouté et favorisent le brunissement de la pâte de moutarde.

MOTS CLÉS : *cuivre, fer, moutarde, brassica juncea, cyanure d'allyle.*

Introduction

Les métaux, et plus spécialement le cuivre et le fer, ont une action nuisible pendant la fabrication et la conservation des denrées alimentaires : ils catalysent différents phénomènes de dégradation, particulièrement ceux d'oxydo-réduction et on les tient pour responsables, en grande partie, de la destruction de certaines vitamines, des arômes et des transformations subies par les matières colorantes.

La graine de moutarde renferme, comme toutes les graines, du cuivre et du fer naturels mais au cours de la fabrication, il existe un enrichissement certain en ces métaux. La première partie de ce travail consiste à déterminer les teneurs moyennes en cuivre et fer de plusieurs graines d'origines différentes, et à rechercher l'importance de l'apport en métaux « technologiques » au cours des opérations de fabrication.

L'isothiocyanate d'allyle (allylsénevol), auquel la moutarde de Dijon doit sa sa saveur caractéristique est un corps instable. On peut imaginer que le cuivre et le fer participent à sa destruction. On étudie donc dans une deuxième partie, le rôle possible de ces métaux sur la formation et la dégradation de l'allylsénevol.

Matériel et méthodes

1. — *Graines et pâtes*

Graines: Brassica juncea, variété Burgonde et Montana en provenance du Canada et des États-Unis.

Brassica juncea, variété Burgonde, origine métropolitaine.

Brassica juncea, d'origines et de variétés diverses, utilisées actuellement par l'industrie condimentaire.

Pâtes : Elles ont été prélevées immédiatement après broyage et après tamisage dans trois usines de la région dijonnaise.

2. — *Dosages*

Dosage du cuivre et du fer

Ils ont été effectués selon les techniques utilisées par JACQUIN (1958) dans les pommes et les cidres et DEIBNER et BOUZIGUES (1953) dans les vins.

a) *Minéralisation :* 10 g de graines ou 20 g de pâte sont préalablement séchées à l'étuve à 103 °C pendant six heures, dans une capsule de quartz. Après dessication, les capsules sont introduites dans un four électrique à moufle de silice à une température d'environ 500 °C $\pm$ 20 °C. Les particules charbonneuses qui peuvent subsister sont éliminées en les écrasant avec un agitateur en présence d'acide nitrique dilué, la capsule est remise ensuite au moufle jusqu'à obtention de cendres uniformément blanches. On reprend les cendres par 5 ml d'acide chlorhydrique à 50 p. 100 et on laisse digérer à froid 30 min; pour bien dissoudre les oxydes et surtout transformer les pyrophosphates en orthophosphates, on évapore à sec au bain-marie bouillant. Le résidu est dissous, ajusté à 100 ml avec de l'acide chlorhydrique normal. On filtre sur verre fritté n° 4 et c'est sur le filtrat que les dosages de cuivre et de fer seront effectués.

b) *Dosage du fer: réactifs*

Solution d'hydroquinone à 2,5 p. 100 dans de l'eau acidulée (10 ml d'H_2SO_4 pur par litre). Cette solution conservée en flacon coloré et au froid doit être remplacée dès l'apparition d'un brunissement.

Solution de sulfite de sodium à 20 p. 100 obtenue à partir de sulfite de sodium neutre et anhydre.

Solution d'orthophénanthroline à 0,5 p. 100 dans de l'alcool à 95 °GL.

Solution aqueuse d'acétate d'ammonium à 20 p. 100.

Mode opératoire :

Dans une fiole jaugée de 50 ml, ajouter successivement :

— 20 ml de la solution obtenue après minéralisation;
— 1 ml d'acide chlorhydrique à 10 p. 100;

— 2 ml de solution d'hydroquinone;
— 2 ml de solution de sulfite;
— 1 ml de solution d'orthophénanthroline;

Laisser reposer 15 mn puis ajouter :

— 10 ml de solution d'acétate d'ammonium.

Compléter à 50 ml et mesurer l'absorbance au colorimètre à une longueur d'onde de 485 nm. On établit une courbe d'étalonnage en utilisant une solution de sulfate ferreux et d'ammonium (sel de Mohr) à 3,510 g/l en présence de 5 ml d'acide chlorhydrique pur. A partir de cette solution mère, on prépare une solution diluée (20 ml dans 500 ml d'eau) dont 1 ml contient 20 μg de fer.

c) *Dosage du cuivre : Réactifs*

— solution de soude normale;
— solution d'acétate de sodium à 50 p. 100;
— solution à 0,02 p. 100 de 2-2 diquinolyle dans l'alcool isoamylique;
— chlorhydrate d'hydroxylamine.

Mode opératoire :

Introduire 10 ml de solution obtenue après minéralisation dans un tube à essai 200/20 mm bouché à l'émeri. Ajouter un volume de soude N correspondant à sa neutralisation diminué de 0,2 ml puis ajouter successivement :

— 2 ml d'acétate de sodium,
— environ 0,5 g de chlorhydrate d'hydroxylamine,
— après homogénéisation, 5 ml de solution amylique de 2-2 diquinolyle.

Agiter le tube pendant deux minutes. Abandonner au repos au moins deux heures ou mieux centrifuger. Prélever à la pipette une partie de la couche amylique colorée et mesurer l'absorbance à l'aide du colorimètre à une longueur d'onde de 540 nm.

On établit une courbe d'étalonnage, en utilisant une solution de sulfate de cuivre à 1 g/l. A partir de cette solution mère, on prépare une solution diluée au centième dont 1 ml contient 2,54 μg de cuivre.

3. — *Dosage de l'allylsénevol*

a) *Graines :* selon la technique de VANGHEESDAELE et BICHOT (1970) (Norme AFNOR NFV n° 32051).

b) *Pâtes :* méthode argentimétrique identique à celle employée pour les graines (l'hydrolyse enzymatique est toutefois supprimée, l'allylsénevol étant déjà libéré dans les pâtes).

4. — *Dosage du cyanure d'allyle*

Après distillation des pâtes, on utilise la chromatographie en phase gazeuse, selon la technique de LATRASSE et VANGHEESDAELE (1972).

5. — *Dosage de l'anhydride sulfureux*

Une moutarde en pâte fraîchement fabriquée ne renferme pas de produits sulfurés volatils susceptibles de causer une interférence dans le dosage iodométrique des sulfites, c'est pourquoi on emploie une méthode simplifiée de dosage du SO_2 par l'iode.

Mode opératoire :

20 g de pâte sont introduits dans un ballon jaugé de 200 ml avec 50 ml d'eau distillée bouillie.

On ajoute ensuite 2 ml de solution d'hexacyanoferrate de potassium à 15 p. 100 puis 2 ml de solution d'acétate de zinc à 30 p. 100, on agite, on complète à 202 ml pour tenir compte du volume du précipité.

Après filtration, on dose l'acide sulfureux sur 50 ml de filtrat par l'iode 0,01 N en milieu acide et en présence d'empois d'amidon comme indicateur. Cette méthode simplifiée a été vérifiée par la méthode REITH et WILLEMS (1958) sur des moutardes très fraîches (moins de 3 jours de fabrication), les résultats obtenus par les deux méthodes ont été pratiquement identiques.

Résultats

1. — *Teneur en fer et en cuivre de diverses graines*

Les graines de moutarde (*Brassica juncea*) traditionnellement utilisées pour la confection de la moutarde de Dijon renferment du cuivre et du fer en proportions assez importantes.

Les teneurs en cuivre et en fer de dix lots de graines d'origine et de variétés diverses sont données dans le tableau 1. Il s'agit de graines actuellement utilisées par les industries condimentaires de Dijon et de sa région. Suivant l'origine et la variété de la graine, les différences entre les teneurs en ces deux métaux peuvent être importantes : c'est ainsi qu'une graine Burgonde d'origine métropolitaine renferme trois fois moins de cuivre qu'une graine Montana en provenance des États-Unis, les teneurs en fer par contre varient sensiblement moins. Les graines européennes sont, en règle générale, plus riches en fer et moins riches en cuivre que les graines américaines. Il est possible que la nature et la composition du sol puissent avoir une certaine action sur la teneur en métaux de la plante, il en est de même sans doute de certains traitements de la plante qui utilisent les sels de cuivre.

PIESSE et STANGEL (1900), MOUSSERON (1927) ont étudié la composition des graines de moutarde (*Brassica nigra*), ils trouvent dans ces graines des taux de cuivre et de fer comparables à ceux que nous avons retrouvés dans la variété *Brassica juncea*, soit : cuivre, 18 mg p. 100 g de cendres, ce qui représente 9 mg /kg de matière sèche et fer, 80 mg p. 100 g de cendres représentant 40 mg /kg de matière sèche.

Sur les différentes graines étudiées, nous avons dosé l'allylsénevol, mais il n'apparaît pas de corrélation entre les teneurs en essence de moutarde et les taux de fer et de cuivre existants dans la graine.

TABLEAU I

Richesse en cuivre et en fer de quelques graines

Graine	Origine	Variété	Teneur en cuivre (mg/kg mat. sèche)	Teneur en fer (mg/kg mat. sèche)	Teneur en allylsénevol (mg p. cent g)
Brassica juncea .	Canada	Burgonde	5,0	37,1	920
Brassica juncea .	U.S.A.	Montana	10,7	54,0	835
Brassica juncea .	U.S.A.	Montana (à téguments jaunes)	4,8	39,1	740
Brassica juncea .	Canada	Burgonde	5,1	34,7	940
Brassica juncea .	Canada	Montana	6,2	40,1	790
Brassica juncea .	Canada	Burgonde	8,5	36,0	740
Brassica juncea .	Pologne	?	5,0	58,5	740
Brassica juncea .	Pologne	?	3,2	32,0	840
Brassica juncea .	France	Burgonde	3,5	51,0	880
Brassica juncea .	France	?	4,3	47,2	830

2. — *Teneur en fer et en cuivre des diverses parties de la graine*

La moutarde de Dijon doit, d'après sa définition officielle (décret du 10 septembre 1937), être débarrassée de la majeure partie de ses téguments (sons), elle doit en effet renfermer moins de 2 p. 100 de téguments ayant échappé au blutage. C'est pourquoi, il nous a paru intéressant de rechercher la teneur en cuivre et en fer des différentes parties anatomiques d'une graine de moutarde et plus spécialement des téguments.

Le cuivre et le fer se retrouvent en quantités très importantes dans le germe et surtout dans les téguments (tabl. 2).

TABLEAU 2

Richesse en cuivre et en fer des diverses parties anatomiques d'une graine

Partie anatomique	Teneur en cuivre (mg/kg matière sèche)	Teneur en fer (mg/kg matière sèche)
Graine entière	8,9	40,6
Amande	4,7	29
Germe	11,0	61
Tégument	24,5	79

3. — *Teneur en fer et en cuivre dans les pâtes de différentes usines*

La moutarde en pâte renferme en moyenne 25 p. 100 de matière sèche en provenance de la graine. Théoriquement la pâte doit donc présenter une teneur en métaux égale au quart de ce que renferme la graine. Les chiffres retrouvés après analyse des pâtes sont nettement plus élevés (tabl. 3), ce qui implique un enrichissement très appréciable au cours de la fabrication. Les métaux technologiques peuvent avoir une double origine d'une part le verjus, d'autre part le matériel au contact avec la moutarde.

TABLEAU 3

Augmentation des teneurs en cuivre et fer au cours de la fabrication

	Graines	Pâte terminée	Apporté par la graine	Apporté par le matériel
Usine A				
Teneur en cuivre (mg/kg)	5,14	1,86	1,28	0,58
Teneur en fer (mg/kg)	34,70	14,90	8,60	6,30
Usine B				
Teneur en cuivre (mg/kg)	7,7	2,8	1,90	0,90
Teneur en fer (mg/kg)	54,0	20,8	13,5	7,30
Usine C				
Teneur en cuivre (mg/kg)	5,0	3,1	1,25	1,86
Teneur en fer (mg/kg)	37,0	23,0	9,25	13,75

4. — *Formation de cyanure d'allyle au cours de la fabrication*

Au cours de la fabrication de la moutarde, on observe une augmentation de la teneur en fer et en cuivre et une diminution concomitante de l'allylsénevol et du SO_2. On constate également une formation relativement importante de cyanure d'allyle dans les moutardes particulièrement riches en métaux (tabl. 4).

Discussion

1. — *Comparaison entre les teneurs en fer et en cuivre de la moutarde et de différents aliments*

Tous les aliments de l'homme renferment du fer et du cuivre et on peut considérer que non seulement ces métaux ne sont pas dangereux aux doses retrouvées, mais même qu'ils sont nécessaires, puisqu'ils apportent à l'organisme les quantités jugées indispensables.

TABLEAU 4

Action du cuivre et du fer sur les teneurs en allylsénevol et cyanure d'allyle et sur les pertes en acide sulfureux pendant la fabrication

Origine des échantillons	Teneur en cuivre (mg/kg)	Teneur en fer (mg/kg)	Teneur en allylsénevol (mg %)	Pertes théoriques en allylsénevol (mg %)	Teneur en cyanure (mg/kg)	SO^2 ajouté (mg %)	SO^2 retrouvé après fabrication (mg %)	Pertes en SO^2 (mg %)	Observations
Usine A									
Graine . . .	5,14	34,7	940	—	—	—	—	—	Température de la pâte à la sortie des meules : 27 °C.
Pâte	1,86	14,9	205	30	50	75	58	17	Coloration de la pâte : jaune clair, non oxydée.
Usine B									
Graine . . .	7,7	54,0	830	—	—	—	—	—	Température de la pâte à la sortie des meules : 35 °C.
Pâte	2,80	20,8	148	59	165	55	18	37	Coloration de la pâte : jaune grisâtre mais n'est pas oxydée.
Usine C									
Graine . . .	5,00	37,0	920	—	—	—	—	—	Température de la pâte à la sortie des meules : 43 °C.
Pâte	3,10	23,0	152	78	231	50	0	50	Coloration de la pâte : jaune brunâtre déjà légèrement oxydée.

Le tableau 5 établi d'après les travaux de RANDOIN et CAUSERET (1949). LANORE (1961) présente les teneurs en fer et en cuivre de différents aliments. Le grain de blé, en particulier, présente des teneurs pratiquement identiques à celles que l'on retrouve dans les graines de moutarde. La concentration des deux métaux dans les différentes parties anatomiques des deux graines est également fort semblable. Cette richesse en métaux dans les téguments et le germe paraît habituelle dans toutes les graines, elle s'explique par la présence importante des enzymes oxydantes (peroxydase, catalase et oxydases) dans les téguments et le germe, le fer et le cuivre entrent en effet dans la composition de ces enzymes.

TABLEAU 5

Comparaison entre les teneurs en fer et en cuivre de la moutarde et de différents aliments

Nature du Produit	Teneur en fer (mg p. cent g)	Teneur en cuivre (mg p. cent g)
Graine de moutarde	4,00	0,80
Blé Graine entier	4,00	0,70
Germe	5,00	1,30
Son	10,00	1,20
Maïs	3,00	0,70
Pommes de terre	1,00	0,15
Viande	2,60	0,25
Lait en poudre	0,70	0,30
Moutarde de Dijon	2,00	0,25
Pain complet	2,20	0,40
Pain blanc	1,00	0,10

2. — *Évolution de la teneur en métaux au cours de la fabrication*

Pour mieux comprendre les résultats donnés dans le tableau 3, il est utile de rappeler brièvement les conditions de fabrication de la moutarde de Dijon : une meule écrase les graines de moutarde, préalablement aplaties et ramollies dans un mélange d'eau, de vinaigre, de chlorure de sodium et d'acide sulfureux (le verjus). La pâte ainsi obtenue est laminée dans un tamiseur centrifuge afin d'éliminer la majeure partie des téguments ou sons, Elle est ensuite stockée dans des cuves de vieillissement où elle est lentement malaxée durant quelques jours, afin de la désaérer, puis est enfin conditionnée. Il existe, suivant les entreprises, quelques variantes à ce processus classique : dans certaines usines, on mouille la graine à l'eau légèrement sulfitée pendant quelque temps avant le broyage sous meule avec le verjus et le stockage en cuve de vieillissement est remplacé par une désaération sous vide, la moutarde pouvant être ainsi conditionnée aussitôt après la fabrication.

Deux des trois entreprises, dans lesquelles nous avons opéré nos prélèvements de graines et de moutarde en pâte, pratiquent la fabrication classique, il s'agit

des usines A et C, l'usine B utilise par contre le trempage à l'eau sulfitée avant broyage et pratique la désaération de la pâte sous vide.

Au cours de la fabrication de la pâte de moutarde, on observe à la fois une diminution de la teneur en métaux par suite de l'élimination des téguments qui en renferme davantage que l'amande et un enrichissement qui compense très largement cette perte.

L'enrichissement est dû, d'une part au verjus et d'autre part au matériel. Les verjus employés par les trois usines ont été analysés, leurs teneurs en cuivre et en fer sont faibles, de l'ordre de 100 μg de cuivre et 500 μg de fer par litre. A signaler que les verjus utilisés il y a une dizaine d'années renfermaient des doses très supérieures, certains possédaient plus de 2 mg de cuivre et plus de 20 mg de fer par litre, on peut considérer que sur ce point particulier, un très net progrès a été réalisé.

La majeure partie des métaux est donc apportée par le matériel utilisé (aplatisseurs, meules, tamiseuses, pompes, cuves et surtout tuyauteries et robinetteries). De plus en plus maintenant on fait appel à l'acier inoxydable et aux matières plastiques, c'est ainsi que dans les deux usines A et B qui ont fait un effort afin d'éliminer au mieux le contact de la moutarde avec les métaux, le fer et le cuivre apportés par le matériel ne représentent que 30 p. 100 du fer total. Dans l'usine C, par contre, où on a conservé un matériel vétuste, on observe que 60 p. 100 des métaux présents dans la pâte sont apportés par le matériel. Il est utile d'ajouter que ces chiffres sont inférieurs à la réalité, car on n'a pas tenu compte dans les calculs, des métaux d'origine biologique éliminés avec les sons et dont il n'est pas possible de calculer l'importance.

3. — *Importance technologique de la teneur en fer et en cuivre*

La moutarde en pâte ne renferme que des traces de fer et de cuivre, cependant, compte tenu du pouvoir catalytique de ces deux métaux, on peut craindre une action néfaste sur le complexe enzymatique (myrosinase), sur le précurseur lui-même et sur l'essence après sa formation.

a) *Action sur l'allylsénevol*

L'action du cuivre et du fer sur la formation de l'allylsénevol paraît modeste, puisque même dans le cas de l'usine C où la perte en huile essentielle dépasse 30 p. 100, il n'est pas permis d'attribuer cette perte importante à la seule action des métaux. Il existe en effet, dans cette usine de nombreuses autres causes susceptibles de créer une perte en allylsénevol (volatilisation par échauffement exagéré des meules en particulier). Cependant une relation certaine existe entre la teneur en fer et surtour en cuivre, et les pertes enregistrées.

b) *Oxydation du SO_2 ajouté*

Les pertes en acide sulfureux sont très fortes et elles sont d'autant plus importantes que les teneurs en métaux de la pâte sont élevées. Le rôle catalytique du fer et du cuivre sur la disparition du SO_2 signalée par Schroeter (1966) apparaît évident. Ce phénomène conduit après oxydation du SO_2 au brunissement rapide de la pâte.

c) *Formation de cyanure d'allyle*

Le cyanure d'allyle peut posséder trois origines : il existe à l'état naturel dans la graine, il résulte de la désulfuration de l'allylsénevol ou bien il provient du glucoside précurseur de l'huile essentielle.

Le cyanure d'allyle est souvent considéré comme un constituant normal et habituel de l'essence de moutarde. CURTEL (1909) estime qu'il existe déjà dans la graine; HOFMANN (1868) obtient des nitriles en distillant différentes variétés de crucifères non broyées.

En répétant l'expérience d'HOFMANN (en distillant des graines de moutarde non broyées), il ne nous a pas été possible de retrouver de cyanure d'allyle même à l'état de trace. C'est pourquoi, cette origine naturelle du nitrile nous paraît difficilement concevable dans le cas de la graine de moutarde.

La désulfuration des huiles essentielles sulfurées par les sels de métaux lourds est souvent signalée. C'est ainsi que l'usage de récipient en cuivre pour distiller l'allylsénevol, formé après hydrolyse, est fortement déconseillé par STOLL et JUCKER (1955) et ANDRÉ (1953) par crainte de voir l'essence de moutarde se transformer en nitrile au contact du cuivre de l'appareil. WEITH (1875) précise également que le cuivre, le zinc ou le fer divisés désulfurent les sénevols en donnant des nitriles et dans certains cas, on observerait la formation de carbylamines, produits intermédiaires de la réaction. On a tenté de vérifier la réalité de l'action du cuivre et du fer sur l'allylsénevol.

1. *Sur de l'allylsénevol pur*

De l'allylsénevol pur (Fluka) a été traité en présence de sel de cuivre ou de fer sous forme de sulfate, à ébullition sous réfrigérant à reflux durant une heure, puis a été distillé dans un appareil de verre. Dans le distillat, on a recherché par chromatographie en phase gazeuse la présence de cyanure d'allyle, il n'a pas été possible de le mettre en évidence.

2. *Sur une graine de moutarde après hydrolyse.*

5 g de graines de moutarde ont subi une hydrolyse enzymatique à 70 °C pendant une heure; après cette hydrolyse, on a ajouté 10 ml d'une solution à 40 g/l de sulfate de cuivre, on a laissé en contact ½ heure et on a distillé. La quantité d'allylsénevol retrouvée après dosage argentimétrique a été identique à celle d'un essai témoin, de plus, la recherche du cyanure d'allyle s'est révélée négative dans quatre essais sur cinq, cependant, dans un cas, on a pu observer la présence très faible de nitrile.

Il apparaît donc que même à la température d'ébullition, l'allylsénevol, qu'il soit de synthèse ou naturel, n'est pas transformé en nitrile par les sels de cuivre ou de fer. Le seul essai où du cyanure d'allyle a pu être retrouvé ne paraît pas devoir être attribué à une désulfuration de l'essence de moutarde, mais plutôt à l'action du métal sur une partie du précurseur demeuré inattaqué par la myrosinase.

Pour permettre de mieux mettre en évidence l'action des métaux sur le précurseur, les essais ont porté sur des graines stérilisées afin d'éviter les perturbations causées par l'action concomitante de la myrosinase.

5 g de graines broyées et tamisées sont jetées dans l'eau à l'ébullition et on maintient l'ébullition ¼ d'heure; après refroidissement, on ajoute 20 ml d'une solution à 10 p. 100 de sulfate de cuivre et de fer et on maintient l'ébullition

¼ d'heure sous réfrigérant ascendant avant distillation. Le distillat passé en chromatographie en phase gazeuse a permis de retrouver des doses importantes de cyanure d'allyle : avec les sels de cuivre, la totalité de la sinigrine est ainsi transformée en nitrile; les sels ferreux et ferriques possèdent, semble-t-il, une action moins marquée, puisqu'on retrouve, en leur présence, moins de 70 p. 100 de la teneur théorique en cyanure d'allyle.

Cette action de certains métaux sur les thioglucosides a déjà été observée et étudiée pour permettre la détoxification de certains tourteaux de crucifères, colza en particulier : Austin, Gent et Wolff (1968) obtiennent des nitriles par action des sels ferreux sur les thioglucosides du colza. Staron (1974) signale également, parmi d'autres procédés de détoxification, le traitement au sulfate ferrique qui aboutit à la formation de nitriles.

Conclusion

Les doses de cuivre qui ont été retrouvées dans les moutardes de Dijon sont toujours inférieures à 5 mg/kg, celles du fer ne dépassent qu'accidentellement 25 mg/kg; à ces doses, la toxicité éventuelle de ces métaux est négligeable.

Toutefois, on a remarqué que ces métaux sont susceptibles, à chaud, de désulfurer la sinigrine pour former un nitrile : le cyanure d'allyle. Dans les moutardes de Dijon, on ne retrouve que des quantités faibles de cyanure d'allyle, elles sont en général inférieures à 250 mg/kg. Cependant il nous a été donné de retrouver des doses très nettement supérieures atteignant 1,2 g/kg en période estivale, et dans des moutardes particulièrement riches en cuivre plus de 15 mg/kg. Avec une telle dose de cyanure d'allyle cette moutarde pouvait être considérée comme toxique. En effet, bien qu'ils n'atteignent pas la toxicité de l'acide cyanhydrique, les nitriles n'en demeurent pas moins des poisons : ils agissent sur le système nerveux central et provoquent en particulier des troubles respiratoires et des phénomènes convulsifs (Bruylants, 1950).

Enfin, par suite de leur action catalytique, le fer et le cuivre accélèrent la disparition de l'acide sulfureux et favorisent ainsi l'oxydation de la pâte et son brunissement.

S'il est difficile, au stade industriel, d'agir sur les métaux naturellement présents dans la graine, on peut réduire les teneurs en métaux apportées par le matériel et l'appareillage : suppression de toutes les parties en cuivre et en fer ou en alliage peu résistant au contact direct avec le verjus ou la pâte de moutarde et remplacer le fer et le cuivre, chaque fois que cela est possible, par un acier inoxydable très résistant ou une matière plastique de qualité alimentaire.

Un seul traitement curatif peut être envisagé quand, pour des raisons économiques, il n'est pas possible de transformer radicalement toute une installation existante : l'emploi d'acide citrique ou tartrique, ces acides, en complexant le fer, réduisent ainsi son pouvoir catalytique. La chaleur favorisant la désulfuration de la sinigrine par les métaux on pourra réduire l'échauffement des meules en utilisant le système de refroidissement existant en général sur les broyeurs.

L'action des métaux et plus spécialement du cuivre sur la sinigrine aboutit à la formation quantitative de cyanure d'allyle. A l'inverse de l'allylsénevol, ce nitrile ne se dégrade pas facilement et on le dose spécifiquement par chromatographie en phase gazeuse. Le dosage de la sinigrine dans les graines de moutarde

peut ainsi être envisagé : traitement de la graine broyée en présence de cuivre, distillation et dosage du cyanure d'allyle formé par chromatographie en phase gazeuse.

Reçu pour publication en octobre 1977.

Summary

Origin and influence of iron and copper during the preparation of the Dijon mustard paste

Determination of Fe and Cu carried out on seeds of Brassica juncea of different origin, have shown that some samples produced in North America have a fairly high content of Cu. The content of Fe is more uniform. The hulls contain more Fe and Cu than the kernels.

The paste contains more Fe and Cu than the seeds, it is due to the corrosion of the material.

High levels of Fe and Cu decrease the content of SO_2 added during processing but are without effect on the stability of allylsenevol in the mustard paste. However, it has been proved that Fe and still more Cu react during the preparation of mustard pasta on the thioglucoside of the seed, producing allylcyanide.

Références bibliographiques

André E., Delaveau P., 1953. Recherches chimiques sur la composition des essences sulfurées des graines de colza. *Ann. Technol. agric.*, **4**, 243.

Austin F. L., Gent C. A., Wolff I. A., 1968. Dégradation des thioglucosides par les sels ferreux. *J. Agr. Food Chem.*, **16** (5), 752.

Bruylants P., 1950, in Grignard. *Traité de chimie organique*, vol. 13, 653-774-*Masson édit.* Paris.

Curtel G., 1909. Analyse des moutardes. *Ann. Fals. Fraudes*, **2**, 1-7.

Deibner L., Bouzigues H., 1953. Les méthodes de dosage colorimétrique de trace de fer dans le vin. *Ann. Technol. agric.*, **1**, 65.

Hofmann A. W., 1868. Ber. dtsch. chem. ges. Cité par Challenger in « *Aspects of the Organic Chemistry of Sulphur* — 1958 — Butterworths Scientific Publications — London.

Jacquin P., 1958. Le fer et le cuivre dans les pommes et les poires et dans les produits cidricoles. *Ann. Technol. agric.*, **2**, 259.

Lanore, 1961. Table de composition des éléments. 3e édition 12, rue Oudinot Paris.

Latrasse A., Vangheesdaele G., 1972. Détermination du cyanure d'allyle dans les pâtes de moutarde. *Ann. Fals. Fraudes*, **697**, 29-36.

Mousseron M., 1927. Recherches chimiques, physico-chimiques et pharmaceutiques sur *Brassica nigra* et son essence. *Thèse de Pharmacie*, Montpellier.

Piesse Ch., Stangel L., 1900. Traité des altérations et falsifications des substances alimentaires. Paragraphe Condiments. *Williers-Collin Edit.*, Paris.

Randoin L., Causeret J., 1949. Les Céréales et leurs dérivés dans l'alimentation. *Alim. et Vie*, **37**, 14.

Reith J. F., Willems J. J. L., 1958. Uber die Bestimmung der schwefligen Saüre in Lebensmitteln. *Z. Lebensmittel Unters.*, **108**, 270.

Schroeter C., 1966. Sulfur dioxide, 51-52. *Pergamon Press*, London.

Staron T., 1974. La détoxification des tourteaux de colza par voie biologique. *Alim. et la Vie*, **62** (3), 165.

Stoll, Jucker, 1955, in Paech et Tracey. Modern methods of plant analysis, vol. 4, 689-718. *Spring Verlag-Berlin.*

Vangheesdaele G., Bichot Isabelle, 1970. Formation des isothiocyanates dans la graine de moutarde broyée, application analytique. *Industr. Agr. Alim.* (2), 125-131.

Weith, 1873 et 1875 — Ber., 6, 210 et 8, 1524. Cité dans *Traité de chimie organique de Grignard*, 1949, 14, 349 — *Masson edit.* Paris.

Ann. Technol. Agric., 1977, **26** (4), 499-510.

La dégradation des thioglucosides par les sels de cuivre (Application au dosage de la sinigrine dans les graines de moutarde)

G. VANGHEESDAELE et Nicole FOURNIER

Station de Technologie des Produits végétaux
Centre de Recherches de Dijon, I.N.R.A., 7, rue Sully, 21034 Dijon Cedex

Résumé

Les sels de cuivre désulfurent à chaud les thioglucosides pour donner des nitriles. La sinigrine en particulier est désulfurée quantitativement en cyanure d'allyle. Le cyanure d'allyle formé est dosé par chromatographie en phase gazeuse. Une méthode de dosage de la sinigrine est décrite, elle fournit des résultats comparables à ceux de la méthode normalisée. On a noté toutefois quelques exceptions dues, soit à un affaiblissement de l'activité enzymatique dans des graines vieillies ou conservées dans de mauvaises conditions, soit à une activité enzymatique secondaire au printemps, au moment de la levée de dormance embryonnaire de la graine.

La méthode décrite a permis de constater que *Brassica nigra* et *Brassica juncea* ne renfermaient qu'un seul et même thioglucoside, la sinigrine. Cette constatation ajoutée à l'étude qualitative des thioglucosides de deux autres crucifères, le colza et la navette, permet de reconnaître d'éventuelles adultérations ou mélanges de ces graines.

L'activité enzymatique d'une graine peut être étudiée, en comparant les résultats de l'analyse chimique après hydrolyse enzymatique et ceux donnés par cette méthode.

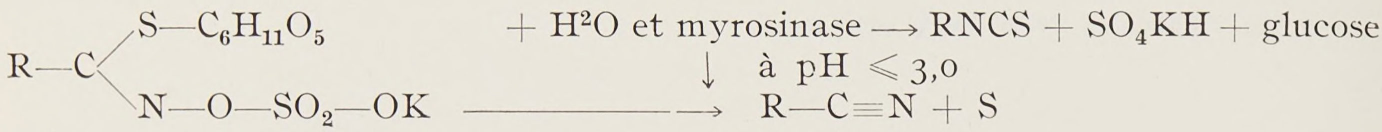
Enfin, la méthode est utilisable dans les pâtes de moutarde et dans ce cas, elle renseigne sur la bonne marche de l'hydrolyse enzymatique au cours de la fabrication.

MOTS CLÉS : *cuivre, thioglucosides, sinigrine, moutarde, colza, cyanure d'allyle.*

Introduction

Les crucifères possèdent un ou plusieurs thioglucosides susceptibles d'être hydrolysés par voie enzymatique pour donner des isothiocyanates. Dans certains cas, il existe à côté de l'isothiocyanate une formation de nitrile. Le nitrile provient, soit directement du précurseur par une réaction encore mal connue, soit à partir de la réaction enzymatique, quand celle-ci est conduite à des pH inférieurs à 3,0

(SCHWIMMER, 1960). Les différentes réactions qui aboutissent à la dégradation des thioglucosides peuvent être ainsi schématisées :



Il existe de nombreuses méthodes de dosage de l'huile essentielle après hydrolyse enzymatique, mais il n'existe pas, à notre connaissance, de méthode de dosage du précurseur lui-même. Les thioglucosides peuvent cependant être dégradés au cours de différentes réactions chimiques : en présence de nickel de Raney, la sinigrine donne de la *n*-butylamine et l'hydrolyse acide de la sinigrine fournit de l'acide vinylacétique probablement par l'intermédiaire du nitrile (CHALLENGER, 1959). Par ailleurs AUSTIN *et al.* (1968) signalent l'action possible des sels de fer sur les thioglucosides du colza, qui conduit à la formation de nitriles. Ces différentes réactions ne paraissent pas être quantitatives et il n'apparaît pas que les observations faites aient abouti à une méthode quantitative d'analyse.

Au cours d'une recherche sur le rôle joué par le fer et le cuivre dans les moutardes en pâtes, on a pu mettre en évidence l'action de ces deux métaux sur la sinigrine : les sels de cuivre, en particulier, désulfurent la sinigrine et la transforment en cyanure d'allyle (VANGHEESDAELE et FOURNIER, 1977). Le cyanure d'allyle formé peut être très aisément dosé par chromatographie en phase gazeuse (LATRASSE et VANGHEESDAELE, 1972).

La mise au point d'une méthode d'analyse, basée sur la transformation de la sinigrine en cyanure d'allyle et le dosage de ce dernier corps par chromatographie en phase gazeuse, demeure le but principal de cette étude, accessoirement on étudie l'action du cuivre sur les thioglucosides de deux autres graines.

I. — Matériel et méthode

a) *La matière première*

Elle est constituée d'une part par des graines de moutarde noire et brune (*Brassica nigra* et *Brassica juncea*) de différentes origines et de différentes variétés (ces graines sont actuellement utilisées pour la fabrication de la moutarde en pâte et proviennent d'usines de la région dijonnaise), d'autre part par des graines de colza et de navette (*Brassica napus* et *Brassica rapa*) en provenance des Stations d'Amélioration des Plantes de Dijon et de Rennes, I.N.R.A.

b) *L'appareillage*

La formation et la distillation du nitrile formé a lieu dans l'ampoule de l'appareil de distillation utilisé par VANGHEESDAELE et BICHOT (1970) pour le dosage de l'allylsénevol (l'ampoule a été dotée d'un entonnoir à robinet, ce qui permet d'effectuer des ajouts au cours de la distillation sans avoir à la débrancher de l'appareil).

Le chromatographe en phase gazeuse utilisé dans les essais est le VARIAN 1 400 d'AEROGRAPH.

c) *Description de la méthode*

1. *Préparation de l'échantillon.*

Après élimination des impuretés, les graines sont pulvérisées dans un moulin à café électrique et tamisées sur un tamis de 0,63 mm d'ouverture de maille.

2. *Désulfuration du glucoside et entraînement à la vapeur du nitrile formé.*

Cinq grammes de mouture sont pesés directement dans l'ampoule de distillation, celle-ci est branchée ensuite à l'appareil de distillation et par l'entonnoir latéral, on introduit 25 ml d'une solution bouillante de sulfate de cuivre à 20 g/l. Le ballon générateur de vapeur ayant été préalablement amené à l'ébullition,

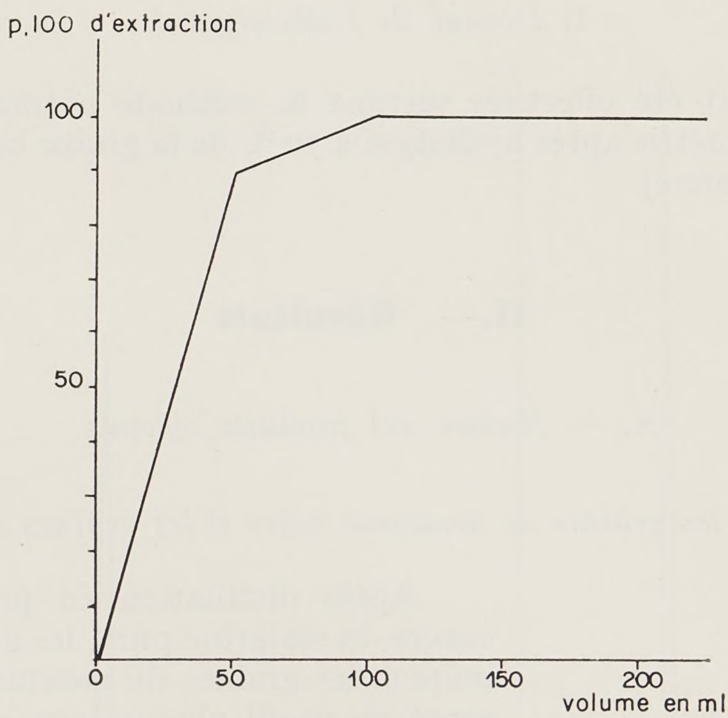


FIG. 1. — *Courbe d'extraction du cyanure d'allyle.*

l'entraînement par la vapeur commence immédiatement. On recueille 150 ml de distillat dans un ballon jaugé de 200 ml. La durée de la distillation n'excède pas dix minutes et on a vérifié qu'après obtention des 100 premiers millilitres de distillat, la désulfuration est totale (fig. 1).

d) *Chromatographie en phase gazeuse*

Appareil: VARIAN 1 400 d'AEROGRAPH, équipé d'une colonne d'acier inoxydable de 3 m de longueur et de 3 mm de diamètre intérieur, remplie de chromosorb W (grains 60/80 mesh) traité par HMDS et imprégné de 15 p. 100 de carbowax 20 M.

Conditions d'analyse:

— analyse isotherme à 100 °C,
— gaz vecteur $N_2 = 25$ ml/min,

— détection par ionisation de flamme (H_2 = 30 ml/min, air = 300 ml/min),
— volume injecté : 1 µl,
— on opère 3 injections successives du distillat,
— étalon interne : *n*-butanol (solution à 100 mg/l).

La droite d'étalonnage a été établie avec des solutions de concentrations connues en cyanure d'allyle (Fluka).

e) *Spectrométrie de masse*

L'ensemble couplé chromatographe en phase gazeuse — spectromètre de masse a été employé. C'est un concentré éthéré obtenu à partir d'un distillat de graines traitées au préalable par le cuivre qui a été analysé.

f) *Dosage de l'allylsénevol*

Les dosages ont été effectués suivant la méthode normalisée NFV.32.051 (dosage par argentimétrie après hydrolyse à 70 °C de la graine broyée et distillation de l'allylsénevol formé).

II.— Résultats

A. — *Nature des produits obtenus*

1. *Sur la sinigrine, les graines de moutarde noire et les graines de moutarde brune.*

Après distillation en présence de sels de cuivre, la sinigrine pure, les graines de moutarde noire et les graines de moutarde brune ont présenté un profil chromatographique absolument identique (fig. 2).

Le pic observé sur les différents chromatogrammes de la sinigrine et des deux variétés de *Brassica* possède un volume de rétention identique à celui donné par le cyanure d'allyle et, de plus, on a confirmé sa nature précise par l'examen de son spectre de masse (fig. 3).

Il nous faut signaler cependant qu'une seule graine de *Brassica juncea*, en provenance de Ceylan a présenté un profil différent, on a pu observer sur le chromatogramme la présence

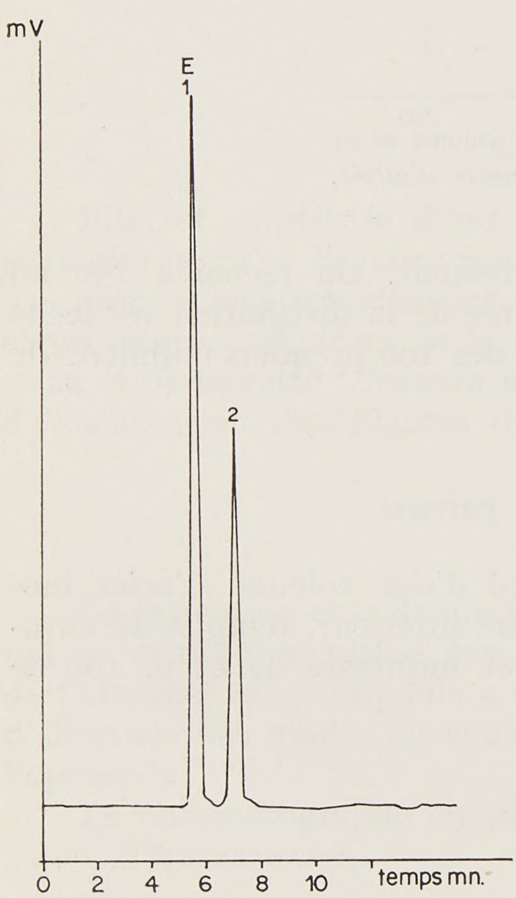


FIG. 2. — *Chromatogramme type du distillat obtenu après traitement par le cuivre de sinigrine pur et de graines* (Brassica nigra *et* Brassica juncea)

E1 = Étalon interne
2 = Cyanure d'allyle

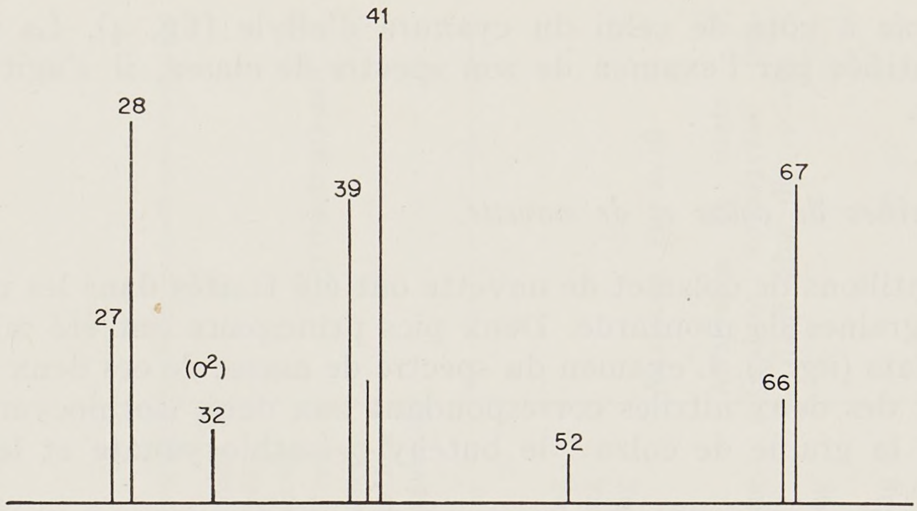


FIG. 3. — *Spectre de masse du cyanure d'allyle.*
Seuls sont mentionnés les pics utilisés pour l'interprétation du spectre.

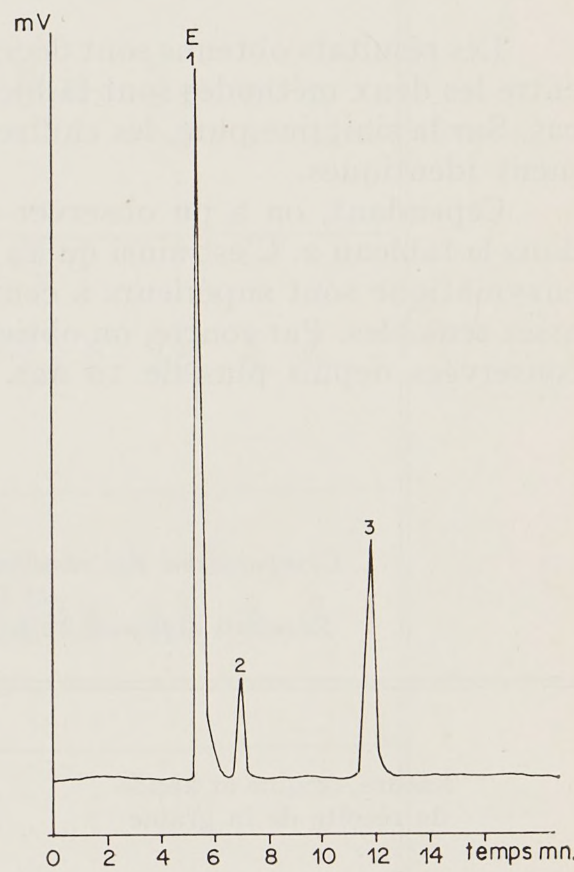


FIG. 4. — *Chromatogramme du distillat d'une graine de moutarde en provenance de Ceylan.*

E1 = Étalon interne
2 = Cyanure d'allyle
3 = Cyanure de butényle

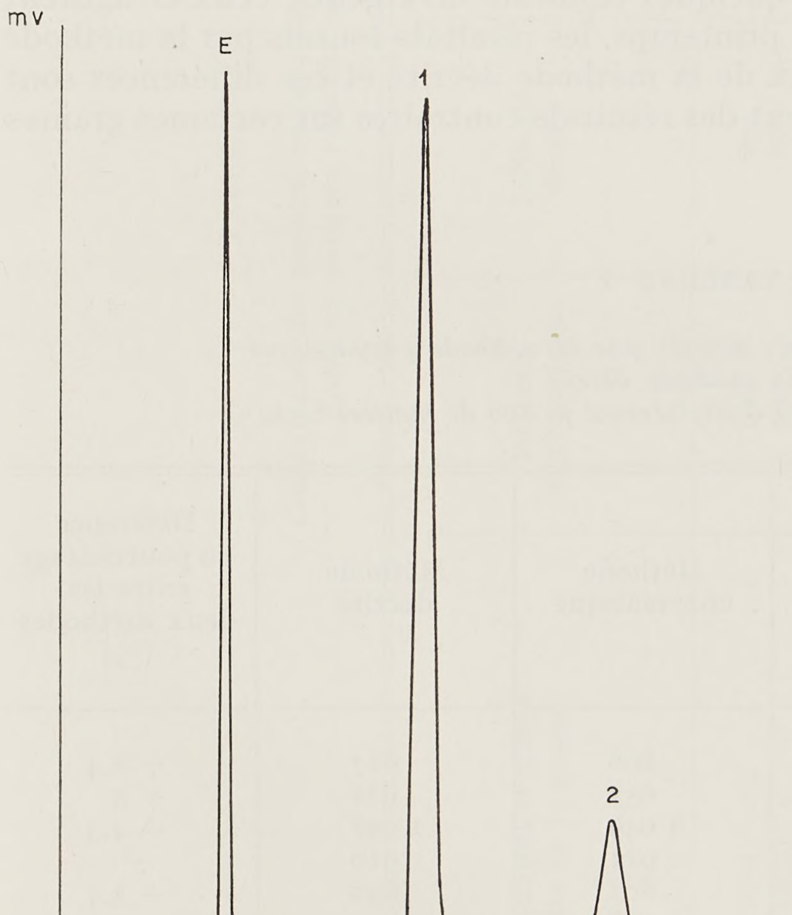


FIG. 5. — *Chromatogramme type du distillat de graines de colza ou de navette en présence de cuivre.*

1 = Cyanure de butényle
2 = Cyanure de pentényle
E = Étalon

d'un second pic à côté de celui du cyanure d'allyle (fig. 4). La nature de ce pic a été identifiée par l'examen de son spectre de masse, il s'agit du cyanure de 3-butényle.

2. *Sur les graines de colza et de navette.*

Des échantillons de colza et de navette ont été traités dans les mêmes conditions que les graines de moutarde. Deux pics principaux ont été mis en évidence dans les distillats (fig. 5). L'examen du spectre de masse de ces deux pics a révélé qu'il s'agissait des deux nitriles correspondant aux deux isothiocyanates volatils principaux de la graine de colza : le butény1-3-isothiocyanate et le pentényl-4-isothiocyanate.

B. — *Comparaison entre les résultats obtenus avec la méthode décrite et la méthode enzymatique*

Les résultats obtenus sont décrits dans le tableau 1. Les différences remarquées entre les deux méthodes sont faibles et inférieures à 5 p. 100 dans la majorité des cas. Sur la sinigrine pure, les chiffres obtenus par les deux méthodes sont pratiquement identiques.

Cependant, on a pu observer quelques résultats divergents, ceux-ci figurent dans le tableau 2. C'est ainsi qu'au printemps, les résultats fournis par la méthode enzymatique sont supérieurs à ceux de la méthode décrite et ces différences sont assez sensibles. Par contre, on obtient des résultats contraires sur certaines graines conservées depuis plus de 10 ans.

TABLEAU I

Comparaison des résultats donnés par la méthode enzymatique et la méthode décrite
Résultats exprimés en mg d'allylsénevol p. 100 de matière sèche

Nature, origine et année de récolte de la graine	Méthode enzymatique	Méthode décrite	Différence en pourcentage entre les deux méthodes (%)
Burgonde Canada (1974)	866	887	+ 2,4
Picra Dijon (1973)	653	688	+ 5
Montana à téguments jaunes (1973)	1 049	1 097	+ 4,3
Burgonde Canada (1975)	911	910	—
Burgonde Côte-d'Or (1976)	802	830	+ 3,4
Burgonde Dijon (1974)	748	739	— 1,2
Montana U.S.A. (1975)	794	800	+ 0,7
Burgonde Canada (1973)	785	820	+ 4,2
Graine Hongroise (1976)	800	810	+ 1
Montana U.S.A. (1976)	810	795	— 2
Graine Suisse (1973)	718	748	+ 4
Burgonde Canada (1976)	930	928	—

TABLEAU 2

Comparaison des résultats obtenus par les 2 méthodes
Étude de quelques résultats anormaux

Nature, origine et année de récolte de la graine	Méthode enzymatique	Méthode décrite	Différence en pourcentage entre les deux méthodes (%)	Recherche du nitrile après ajout de cuivre sur le résidu de distillation de l'allylsévenol	Observations
Burgonde Centre (1974)	904	995	+ 9,1	++	—
Burgonde Centre (1972)	735	895	+ 17,9	135 mg	
Burgonde Dijon (1973)	937	1 083	+ 13,5	140 mg	
Montana jaune Dijon (1973)	940	1 090	+ 13,7	130 mg	—
Burgonde Canada (année de récolte inconnue)	850	790	— 7		Analysée en avril
Burgonde Dijon (1975)	990	825	— 16,7		Analyséee en mars
Burgonde Canada (année de récolte inconnue)	640	860	+ 25	180 mg	Graines conservées pendant plus de 10 ans.
Burgonde Centre (année de récolte inconnue)	700	905	+ 29	150 mg	»
Montana États-Unis (année de récolte inconnue)	530	780	+ 32	230 mg	»

C. — *Localisation de la sinigrine dans la graine*

Après un léger mouillage, des graines ont été soigneusement décortiquées à la main, les deux principales parties anatomiques de la graine ont été traitées par le cuivre et on a pu se rendre compte que la sinigrine est entièrement localisée dans les cotylédons et que les téguments n'en renferment pas.

III. — Discussion

1. *Nature de la réaction*

Après avoir fait réagir le sel de cuivre sur la sinigrine pure, on observe la présence d'un précipité très léger et noirâtre. L'action de l'acide chlorhydrique concentré sur ce précipité fait apparaître de l'hydrogène sulfuré. Nous avons donc affaire à une réaction de désulfuration.

2. *Présence d'un seul thioglucoside dans les graines de* Brassica juncea

La présence de la seule sinigrine dans les graines de *Brassica nigra* est acceptée par tous, en ce qui concerne *Brassica juncea,* il n'en est pas de même. C'est ainsi que le Codex français ne permet pas l'utilisation de la graine de *Brassica juncea* alors que la pharmacopée des États-Unis l'autorise expressément et l'identité de composition des essences sulfurées fournies par l'une ou l'autre de ces deux sortes de graines y est même affirmée d'une manière catégorique (André, 1951).

On sait que *Brassica juncea* est une espèce hybridogène obtenue par croisement de *Brassica nigra* et de *Brassica rapa* ou *campestris* (Morinaga, 1934) et d'après André (1951) il est possible que certaines graines de *Brassica juncea* aient tendance à retourner vers l'un ou l'autre de leur géniteur, *Brassica nigra* ou *Brassica rapa* d'où les résultats contradictoires constatés dans les dosages de leur essence. Cette explication permettrait de comprendre les résultats anormaux constatés sur la graine d'origine de Ceylan pour laquelle nous avons montré la présence de deux thioglucosides. Il peut s'agir également de l'action du terrain ou du climat, Hemingway *et al.* (1961) qui ont étudié 86 échantillons de *Brassica juncea* et analysé leurs essences par chromatographie sur papier ont, en effet, constaté une corrélation entre les essences analysées et la distribution géographique. Enfin il n'est pas impossible également que dans certains cas il existe des mélanges de graines d'origine et de variétés diverses. Quoi qu'il en soit il est certain que les graines de *Brassica juncea,* susceptibles de renfermer le thioglucoside précurseur de l'isothiocyanate de 3-buténylе sont à proscrire absolument de la moutarde de table car elles lui communiquent un arrière-goût désagréable rappelant le chou. L'examen chromatographique du distillat des graines après traitement par le cuivre devrait permettre d'éviter de tels accidents.

3. Présence de deux thioglucosides principaux dans le colza et la navette.

GASSET (1967) précise qu'il est possible de rencontrer six thioglucosides différents dans la graine de *Brassica napus*, trois sont toujours présents : la gluconapine, la glucobrassicanapine et la progoïtrine. Nous avons pu mettre en évidence dans les distillats des 12 colzas examinés, la présence de pentène-4-nitrile qui correspond à la gluconapine de l'héxène-5-nitrile qui correspond à la glucobrassicanapine et dans un seul d'entre eux, le phényl-3-propane-nitrile qui correspond à la gluconastrutiine. Par contre, il n'a pas été possible de vérifier la présence de la progoïtrine, le nitrile formé n'étant pas volatil.

L'étude des nitriles formés après traitement d'un mélange de graines par le cuivre permet donc l'identification de la moutarde dans le colza. On a pu retrouver

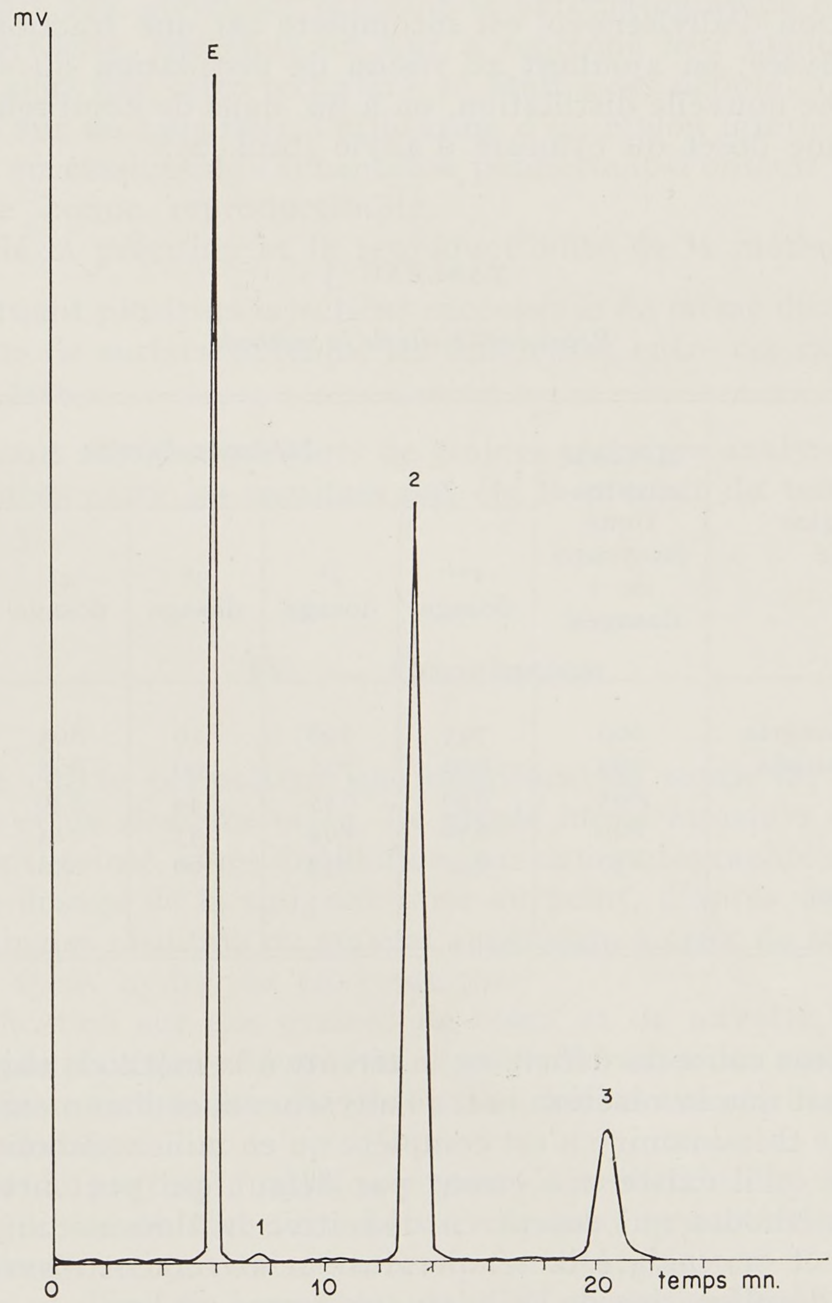


FIG. 6. — *Chromatogramme du distillat d'un mélange de graines de colza et de moutarde* (2 p. cent).

1 = Cyanure d'allyle
2 = Cyanure de butényle
3 = Cyanure de pentényle
E = Étalon

ainsi dans un mélange réalisé au laboratoire, 3 p. 100 de graines de colza mélangées à de la moutarde, les 2 pics caractéristiques du colza demeuraient encore visibles. Il en est de même dans le cas d'un mélange de graines de moutarde et de graines de colza (fig. 6).

4. *Comparaison des résultats obtenus par la méthode enzymatique et par la méthode décrite*

En règle générale, le dosage des nitriles fournit des résultats légèrement supérieurs à ceux de la méthode normalisée. La faiblesse des résultats obtenus avec la méthode enzymatique peut être expliquée par 2 causes principales :

a) l'activité enzymatique est affaiblie (on le constate particulièrement sur les graines conservées de longues années dans de mauvaises conditions) et par suite la production d'allylsénevol est incomplète car une fraction du précurseur n'est pas hydrolysée; en ajoutant au résidu de distillation du sulfate de cuivre et en opérant une nouvelle distillation, on a pu, dans de nombreux cas, mettre en évidence et même doser du cyanure d'allyle (tabl. 2);

TABLEAU 3

Reproductibilité de la méthode

Nature et origine de la graine	Méthode enzymatique (moyenne de 2 dosages)	Méthode décrite					Moyenne
		1er dosage	2e dosage	3e dosage	4e dosage	5e dosage	
Brassica juncea Hongrie .	800	795	798	810	805	812	804
Brassica juncea Canada .	780	802	791	796	808	798	799
Burgonde Centre	805	830	835	844	839	—	837
Burgonde Canada	820	836	804	833	814	843	826
Brassica juncea (origine inconnue)	830	842	853	860	850	840	849

b) la deuxième cause du déficit est inhérente à la méthode chimique de dosage employée : on sait que la réaction entre l'allysénevol et l'ammoniaque qui aboutit à la formation de thiosinamine n'est complète qu'en milieu alcoolique pur, et MOLL (1964) considère qu'il existe une erreur par défaut qui peut atteindre 5 p. 100 sur toutes les méthodes qui dosent en définitive la thiosinamine. Enfin il n'est pas impossible, et ce, malgré la température relativement élevée de l'hydrolyse, qu'une certaine désulfuration de l'allylsénevol formé ait lieu.

Il existe quelques exemples de graines de moutarde pour lesquelles le dosage classique a révélé des chiffres supérieurs à ceux du dosage décrit. Il est curieux de constater que les analyses qui ont fourni ces résultats aberrants, ont été effectuées pendant les mois de mars, avril et quelquefois début mai. Nous n'avons

aucune explication scientifique à donner à cette observation que nous constatons depuis de nombreuses années.

Peut-être devons-nous admettre l'hypothèse suivante : à la suite de la levée de dormance embryonnaire de la graine, on assiste à la production de dérivés sulfurés ayant une origine autre que la sinigrine, méthionine ou cystine par exemple, ces acides aminés représentent en effet près de 10 p. 100 des acides aminés totaux de *Brassica juncea* (BOUQUET, 1971). On constate d'ailleurs, en industrie condimentaire, que les moutardes fabriquées au printemps sont d'une qualité inférieure; on enregistre alors très souvent des débordements, des phénomènes de synérèse et surtout une rapide disparition du « piquant ».

5. *Précision et reproductibilité de la méthode*

On reconnaît aux méthodes utilisant la chromatographie en phase gazeuse, une grande spécificité, toutefois on leur a reproché leur manque de précision. Cela était vrai alors que cette technique en était à ses débuts; de nos jours, les progrès réalisés sur les appareils, l'utilisation d'un étalon interne et le fait d'opérer 3 injections successives de l'échantillon permettent d'obtenir de bons résultats et surtout une bonne reproductibilité.

On a vérifié la précision et la reproductibilité de la méthode :

a) en effectuant plusieurs injections successives du même distillat, et en mesurant les rapports de surface obtenus, les différences entre ces rapports sont inférieures à 2 p. 100.

b) en répétant sur plusieurs lots de graines certaines analyses jusqu'à 5 fois. Les différences entre les résultats ont été la plupart du temps inférieures à 3 p. 100 (tabl. 3).

IV. — Conclusion

Les sels de cuivre permettent une désulfuration totale du thioglucoside de *Brassica juncea* et de *Brassica nigra*. Le nitrile formé au cours de cette réaction peut être facilement dosé, après distillation, par chromatographie en phase gazeuse. La méthode de dosage de la sinigrine mise au point, d'après cette observation, permet d'obtenir des résultats en général supérieurs à ceux de la méthode d'analyse chimique, après hydrolyse enzymatique.

Après vérification sur des graines de colza et de navette, il apparaît que cette méthode pourrait sans doute être étendue à toutes les crucifères possédant des thioglucosides susceptibles de fournir des huiles essentielles volatiles, après hydrolyse enzymatique.

Cette méthode peut être appliquée pour la recherche de certains mélanges frauduleux de graines de diverses espèces, elle peut permettre, en la combinant avec l'analyse enzymatique, de détecter la qualité médiocre de certains lots de graines (graines vieillies ou conservées dans de mauvaises conditions et dont la myrosinase est absente ou très affaiblie).

La méthode peut être également utilisée sur des moutardes en pâte. Elle doit permettre dans ce cas de détecter l'origine de certains accidents de fabrication : pâte amère par suite de la présence de sinigrine non hydrolysée en parti-

culier. De tels accidents sont chose courante, les origines les plus fréquentes étant les suivantes : échauffement de la pâte sous les meules au moment du broyage, pH trop faible, teneur en acide sulfureux trop élevée, enfin toutes autres causes aboutissant à la destruction totale ou partielle de la myrosinase.

Reçu pour publication en octobre 1977.

Summary

Thioglucoside degradation by copper salts:
Application to the quantitative analysis of sinigrin in mustard seeds

The copper salts when heated desulphurize the thioglucosides and produce nitriles. The sinigrin in particular is quantitatively desulphurized and changed in allyl cyanide. The allyl cyanide formed is determined through gas chromatography. A method for the quantitative analysis of the sinigrin is described, it gives results similar to those obtained with the standardized method. We observe some exceptions due either to a reduction of the enzymatic activity in old seeds or in seeds kept under bad conditions, either to a secondary enzymatic activity in spring at the breaking of the seed embryo dormancy.

The method described allowed to state that *Brassica nigra* and *Brassica juncea* contained only one and the same thioglucoside, the sinigrin. This statement joined to the qualitative study of the thioglucosides contained in the two other crucifers, rapeseed and turnip rapeseed allows to identify possible adulterations or mixing of these seeds.

The enzymatic activity of a seed can be studied by comparing the results of the chemical analysis after an enzymatic hydrolysis with those given by this method.

Lastly the method can be used in mustard pastes and in this case it gives information on the progress of the enzymatic hydrolysis during the production.

Références bibliographiques

ANDRÉ E., 1951. Étude des graines de *Brassica juncea. Ann. Agron.*, (*A*), 447-453.

AUSTIN F. L., GENT C. A., WOLFF I. A., 1968. *J. Agr. Food. Chem.*, **16**, 752-755.

BOUQUET Cl., 1971. Étude des fractions azotées de *Brassica juncea.* Thèse Dijon.

CHALLENGER F., 1959. Aspects of the organic Chemistry of Sulphur. 115-161, *Butter Worths* London.

GASSET J., 1967. Les composés soufrés du tourteau de colza. *Rev. frse Corps gras*, **10**, 593-600 et **11**, 649-657.

HEMINGWAY J. S., SCHOFIELS H. J. et VAUGHAN J. G., 1961. *Nature*, **192**, 993-998.

LATRASSE A., VANGHEESDAELE G., 1972. Détermination du cyanure d'allyle dans les pâtes de moutarde. *Ann. Fals. Exp. Chim.*, **697**, 29-36.

MORINAGA, 1934, cité par HARBERD D. J. Cytotaxonomic Studies of *Brassica* and related genera in VAUGHAN *et al.*, *The Biology and Chemistry of the Cruciferoe*, 1976. Academic Press, London.

MOLL A., 1963. Ein Beitrag zur methodik der Senfölbestimmung in Brassicasamen. *Der Züchter*, **33**, 109-113.

SCHWIMMER S., 1960. Myrosin-catalysed Formation of Turbidity and Hydrogen Sulfide from Sinigrin. *Act. Chem. Scand.*, **14**, 1439-1452.

VANGHEESDAELE G. et BICHOT J., 1970. Formation des isothiocyanates dans la graine de moutarde broyée. *Ind. Alim. Agr.*, **2**, 125-131.

VANGHEESDAELE G. et FOURNIER N., 1977. Le cuivre et le fer dans la graine de moutarde *Brassica juncea* (à paraître).

Ann. Technol. Agric., 1977, **26** (4), 511-523.

Epuration biologique en pilotes de laboratoire des liqueurs noires de papeteries Kraft

J. P. TOUZEL et J. N. MORFAUX

Station de Technologie Alimentaire
Centre de Recherches de Lille, I.N.R.A.
369, rue Jules-Guesde
59650 Villeneuve d'Ascq

Résumé

Des liqueurs noires de deux papeteries utilisant le procédé Kraft ont été soumises à des tests de biodégradabilité et leur toxicité vis-à-vis des boues activées a été évaluée par des mesures respirométriques. La mise en œuvre, au laboratoire, de pilotes d'épuration biologique fonctionnant en continu selon le procédé des boues activées, a permis de montrer qu'il est possible d'éliminer 60 à 80 p. 100 de la DCO de ces eaux à condition de les supplémenter en azote et phosphore ou de les traiter en mélange avec des eaux usées urbaines.

L'épuration biologique ne permet pas d'éliminer complètement la coloration due à la présence de dérivés de la lignine non biodégradables.

MOTS CLÉS : *papeteries, liqueurs noires, épuration biologique.*

I. — Introduction

L'obtention de cellulose par le procédé Kraft est basée sur la délignification du matériel végétal par autoclavage en milieu fortement alcalin et en présence de sulfure de sodium. Outre leur charge minérale importante, ces liqueurs de cuisson (ou liqueurs noires) renferment tous les produits de dégradation alcaline de la lignine et des hémicelluloses.

Dans les très grosses unités produisant plusieurs centaines de tonnes par jour, les eaux de cuisson sont concentrées et brûlées. On récupère ainsi une partie des réactifs de cuisson et on élimine la pollution organique.

Cependant, les usines plus anciennes et de moindre importance ne sont pas équipées de tels dispositifs. Le rejet des liqueurs de cuisson constitue un flux parti-

culièrement polluant qu'il est indispensable d'épurer avant son déversement dans le milieu récepteur.

Le traitement des liqueurs Kraft par boues activées est l'un des moyens d'épuration envisageable, mais à la suite des difficultés rencontrées dans la pratique, il était indispensable de vérifier si ces rejets avaient ou non, de par leur nature, un effet toxique sur les microorganismes des boues activées et de préciser éventuellement les conditions de prétraitement qui permettraient un fonctionnement normal des stations d'épuration traitant directement ou en mélange ce type d'effluent.

En effet, le traitement biologique peut, selon les cas, être réalisé sur la liqueur noire diluée après supplémentation en azote et phosphore ou sur un mélange avec des eaux urbaines.

Nous avons étudié les possibilités d'épuration biologique des liqueurs noires de deux papeteries utilisant le procédé Kraft pour la fabrication de papiers supports de carbone et papiers à cigarette à partir de chanvre et de lin. Deux considérations sont à prendre en compte : le rendement d'épuration et la réduction de la coloration de l'effluent. En effet, la coloration des eaux est due principalement aux alcali-lignines qui, *a priori*, sont très peu biodégradables. Cependant, on observe, lors du traitement par boues activées, l'élimination partielle de ces lignines. Les phénomènes mis en jeu sont encore mal connus. Seules quelques rares études récentes ont été consacrées au devenir des alcali-lignines obtenues à partir des feuillus et des résineux (Ganczarczyk et Obiaga, 1973 et 1974) lors du traitement biologique.

Présentation des essais

Les possibilités d'épuration biologique ont été explorées par la mise en œuvre de pilotes de laboratoire fonctionnant en continu et reproduisant à l'échelle miniature une station d'épuration biologique par boues activées. Les résultats obtenus dans le cas de l'une des deux usines devaient servir à améliorer le fonctionnement d'une station d'épuration de 100 000 équivalents - habitants, traitant en mélange les effluents urbains (20 000 m^3/j) et les rejets industriels (6 000 m^3/j) représentant 30 p. 100 de la DBO_5 globale admise. Nous ne traiterons pas ici du problème de l'application pratique.

Deux séries de tests préliminaires permettent de préciser les possibilités d'épuration biologique, de donner un ordre de grandeur de la dilution requise pour l'alimentation du pilote et de définir les prétraitements nécessaires.

Ces tests sont :

— d'une part, des tests de biodégradabilité en « batch » où les eaux noires diluées et ensemencées par des boues activées sont aérées plusieurs jours au cours desquels on suit l'évolution de la DCO brute et de la DCO soluble. La DCO brute est faite sur le mélange eau + boues activées (liqueur mixte) et permet d'évaluer la demande biochimique en oxygène suivant la méthode de Catroux et Morfaux (1971). La DCO soluble est faite sur l'eau débarrassée des boues par centrifugation et permet de suivre l'épuration des matières dissoutes;

— d'autre part, des tests de toxicité où l'on évalue l'inhibition de la respiration des boues activées sur glucose en présence de quantités variables du toxique présumé.

II. — Matériel et méthodes

Matériel

Les eaux noires proviennent de deux usines (nommées I et II dans le texte) fabriquant du papier à cigarette et des papiers supports de carbone à partir de lin et de chanvre par le procédé Kraft. Elles sont prélevées après la cuisson, avant lavage.

Les boues activées utilisées dans les essais biologiques ont pour origine le bassin d'aération d'une station d'épuration urbaine traitant en mélange des effluents d'industries alimentaires.

Méthodes

— DCO (demande chimique en oxygène) : méthode normalisée AFNOR et méthode automatisée sur autoanalyseur (Morfaux et Sarris, 1974).

— DBO_5 : méthode par différence de DCO (Catroux et Morfaux, 1971).

— Sulfures et mercaptans : méthode titrimétrique à l'iode après entraînement des sulfures par un gaz inerte (Standard Methods for Examination of Water and Waste Water, 12th edition, 1972, pp. 552-555).

— Matières en suspension totales (MeST) : méthode par filtration sur disques en fibre de verre Whatman GF/C; séchage à 103 °C et pesée (Wyckoff, 1964).

— Indice de Mohlman (ou S.V.I. : sludge volume index) : volume (en ml) occupé par un gramme de boues après 30 min de décantation de la liqueur mixte du bassin d'aération.

— Respirométrie : l'appareil utilisé est un respiromètre Gilson à pression constante qui permet de lire directement les volumes gazeux échangés.

Les incubations sont faites en présence d'air à 25 °C. Le volume final est de 2,5 ml par cupule. Le gaz carbonique dégagé par les microorganismes est piégé par 2 ml de potasse à 20 p. 100 placés dans le puits central. Pour augmenter la surface d'échange, on ajoute un carré (1,8 $\times$ 1,8 cm) de papier filtre plié en accordéon.

III. — Essais d'épuration biologique

Caractéristiques des effluents (liqueurs noires)

Les analyses des divers échantillons d'eaux noires ont donné les résultats présentés au tableau 1.

Ces eaux ont été conservées à + 4 °C jusqu'au moment des essais et n'évoluent pratiquement pas du fait de leur forte DCO et de leur pH élevé. Notons également que ces effluents ne contiennent pratiquement pas d'azote et de phosphore.

TABLEAU I

Résultats d'analyses sur les eaux noires

Nº d'échantillon	Ia	Ib	IIa	IIb
DCO brute (mg O_2/l)	178 760	217 800	141 300	127 000
DBO_5 brute (mg O_2/l)	70 430	78 400	59 500	51 900
Sulfures (en g de S/l)	2,08	1,78	3,33	2,69
pH	12,6	13,0	13,1	13,1

Essais préliminaires

A) *Biodégradabilité en « batch ».*

a) *Essais de dilution.*

Diverses dilutions des eaux noires dans l'eau du robinet ont été amenées à pH 8 par addition d'acide sulfurique 5N et ensemencées avec une suspension de boues activées (10 ml à 12,44 g/l de matières en suspension totales) provenant d'une station d'épuration. Deux d'entre elles ont reçu, en outre, un volume d'eau usée domestique qui apportait une supplémentation en nutriments (N et P). Ces échantillons d'un volume final de 1,5 l ont été placés dans des erlenmeyers de 2 l agités par un agitateur magnétique et aérés par barbotage d'air comprimé saturé d'eau.

Les DCO des échantillons bruts ainsi que celles d'un surnageant de centrifugation (DCO soluble) ont été suivies pendant 14 jours.

Les échantillons testés sont constitués par les cinq mélanges décrits au tableau 2.

TABLEAU 2

Constitution des milieux pour l'essai de traitabilité en batch

Nº	Dilution finale de l'eau noire	Eau noire au 1/50 dans l'eau distillée	Eau du robinet	Eau usée (*) domestique
1	100 fois	750 ml	750 ml	0
2	200 fois	375 ml	1 125 ml	0
3	400 fois	187,5 ml	1 312,5 ml	0
4	100 fois	750 ml	0	750 ml
5	200 fois	375 ml	375 ml	750 ml

(*) Caractéristiques de l'eau usée domestique : DCO = 460 mg O_2/l; MeST = 162 mg/l.

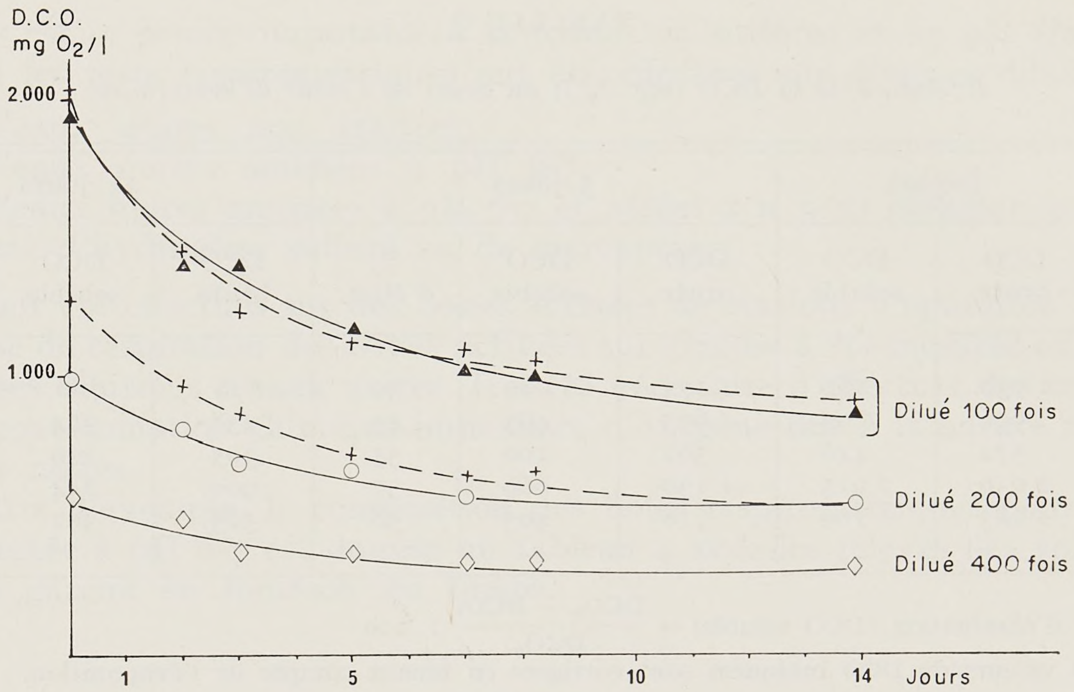


FIG. 1. — *Évolution de la DCO brute dans l'essai de traitabilité en batch.*

——————— dilutions avec eau du robinet.
- - - - - - - - - dilutions avec eau résiduaire domestique.

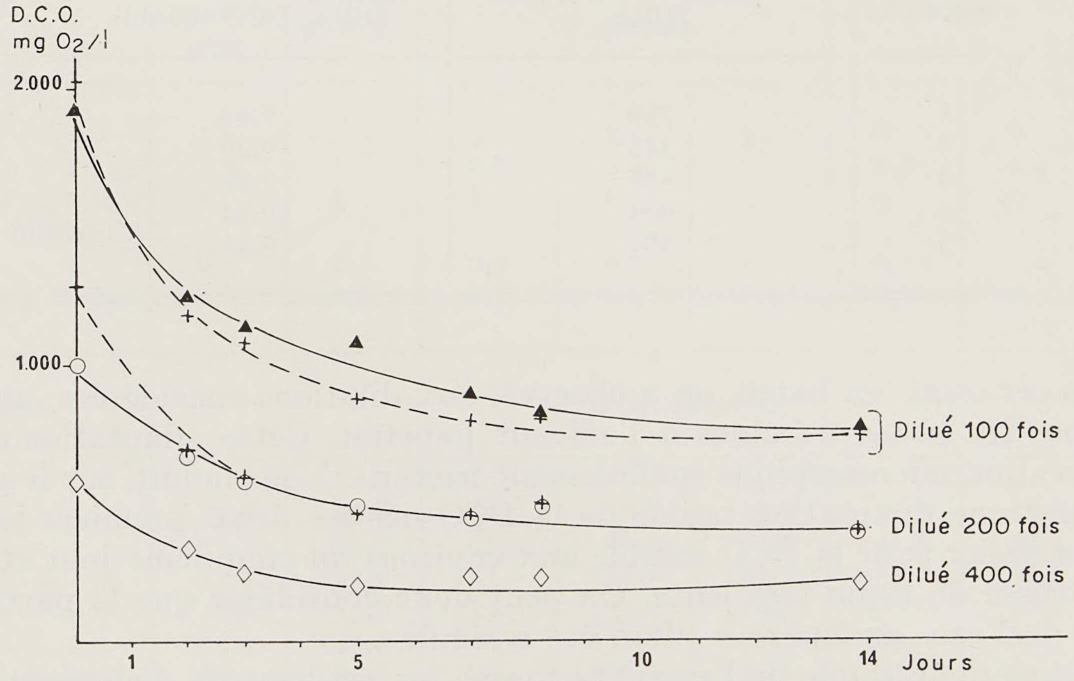


FIG. 2. — *Évolution de la DCO soluble dans l'essai de traitabilité en batch.*

——————— dilutions avec eau du robinet.
- - - - - - - - - dilutions avec eau résiduaire domestique.

Les cinétiques d'élimination de la DCO sur une période de 14 jours sont données aux figures 1 et 2.

Les pourcentages d'élimination de la DCO au bout de 5 et 14 jours sont indiqués au tableau 3.

Les demandes biochimiques en oxygène en 5 jours, calculées à partir des

TABLEAU 3

Évolution de la DCO (mg O_2/l) au cours de l'essai de traitabilité

Temps / N°	Départ		5 jours			14 jours		
	DCO brute	DCO soluble	DCO brute	DCO soluble	% d'élim.	DCO brute	DCO soluble	% d'élim.
1 . . .	1 930	1 786	1 175	1 089	39	879	786	56
2 . . .	996	893	673	493	45	538	374	58
3 . . .	572	446	362	200	55	305	206	54
4 . . .	2 030	2 015	1 130	866	57	900	744	63
5 . . .	1 283	1 106	718	463	58	525	392	64

— % d'élimination (DCO soluble) = $\frac{DCO_0 - DCO_t}{DCO_0} \times 100$

— les valeurs de DCO indiquées sont corrigées en tenant compte de l'évaporation.

DCO brutes selon la méthode de CATROUX et MORFAUX (1971), donnent les valeurs suivantes :

N°	DBO_5	DBO_5/DCO soluble
1	759	0,42
2	325	0,36
3	211	0,47
4	904	0,44
5	568	0,51

Dans ces essais en batch, on a observé, aux dilutions considérées, une rapide adaptation des boues urbaines à l'effluent papetier. Cette adaptation décelable par observation microscopique (pullulement bactérien), se traduit, sur le plan analytique, par une diminution rapide de la DCO dès les deux premiers jours. On atteint un palier pour la DCO soluble aux environs du cinquième jour et dès lors la DCO baisse de façon très lente. On peut donc considérer que la partie biodégradable de l'eau résiduaire a alors été assimilée.

Sur la période totale de l'essai (14 jours), les rendements d'élimination de la DCO sont de l'ordre de 60 p. 100 : sans supplémentation par une eau usée domestique, ils vont de 54 à 58 p. 100 et, avec supplémentation, ils atteignent 63 à 64 p. 100. Il faut noter que l'élimination de la DCO soluble tient compte de phénomènes assimilatoires purement biologiques (DBO_5) mais aussi de phénomènes physiques d'élimination tels que l'adsorption sur les boues.

b) *Essais de toxicité.*

Malgré des rendements d'épuration relativement modestes en DCO, cet essai de traitabilité n'interdit pas le traitement biologique. Toutefois des essais de toxicité ont été effectués au respiromètre. L'éventuelle toxicité des effluents

papetiers est, *a priori*, imputable à la teneur en sulfures et au pH élevé. C'est pourquoi les tests respirométriques ont été effectués sur diverses dilutions :

1. d'eaux noires non traitées,
2. d'eaux noires amenées à pH 6-7,
3. d'eaux noires amenées à pH 6-7 et aérées 2 h pour éliminer les sulfures sous forme d'hydrogène sulfuré ou de mercaptans.

Ils ont été effectués sur des boues activées de stations d'épuration urbaines. La vitesse de respiration des boues activées sur glucose a été mesurée en présence de diverses dilutions d'eaux noires. Il a été nécessaire d'effectuer des corrections pour la consommation chimique immédiate d'oxygène due à la nature réductrice des eaux noires.

A titre d'exemple, la composition des fioles respirométriques pour une eau noire amenée à pH 6-7 est donnée au tableau 4 avec les relevés des volumes des échanges gazeux en fonction du temps.

TABLEAU 4

Essai de respirométrie pour évaluation de la toxicité

Conditions expérimentales : volume final = 2,5 ml/cupule
température = 25 °C

	Respir. endogène	Témoin glucose	Eau noire + boues + glucose			Eau noire + glucose		
Fioles N°	1	2	3	4	5	6	7	8
Eau (ml)	1,5	1	0,8	0,4	0	1,8	1,4	1
Boues (ml)	1	1	1	1	1	0	0	0
Eau noire diluée (*) (ml)	0	0	0,2	0,6	1	0,2	0,6	1
Glucose 0,05 M (ml)	0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Temps	**µl d'O_2 absorbé**							
5 mn	31,8	35,8	49,8	45,8	39,0	19,5	39,9	32,2
10 mn	75,7	74,7	81,7	86,6	77,7	41,6	56,2	57,4
15 mn	71,3	102,0	111,6	112,7	104,2	53,2	68,8	72,5
20 mn	78,6	123,6	135,9	133,4	124,7	60,2	76,9	80,4
25 mn	85,4	145,8	158,3	152,0	141,5	63,0	82,3	86,1
30 mn	87,9	161,8	178,4	166,9	154,8	63,6	84,0	90,0
35 mn	90,0	178,8	196,6	181,7	167,9	65,0	85,3	93,2
40 mn	93,8	194,7	215,2	196,9	189,6	66,6	86,9	96,0
45 mn	97,3	209,7	232,2	209,9	192,0	67,0	88,5	98,1
50 mn	97,3	222,6	250,7	225,7	205,2	67,7	89,0	100,8
55 mn	100,4	239,2	267,1	238,8	214,2	67,5	89,3	101,0
60 mn	101,9	252,3	283,0	252,3	225,5	68,2	90,0	101,8
1 h 15	112,3	290,7	328,7	292,3	254,8	69,6	93,3	106,2
1 h 30	118,2	317,2	368,6	328,2	281,0	69,4	93,3	119,8
1 h 45	126,1	343,7	408,2	366,5	310,5	69,5	93,8	110,0
2 h	131,3	368,0	443,5	405,7	342,1	71,0	95,5	112,6

(*) Dilution initiale (1/20 dans l'eau distillée) ajustée à pH 7.

La fiole 1 correspond à la respiration endogène des boues.

La fiole 2 correspond à la respiration sur glucose seul.

Les fioles 3, 4 et 5 correspondent à la respiration sur 3 dilutions d'eau noire avec glucose (1/250e, 1/83e, 1/50e).

Les fioles 6, 7 et 8 ne contiennent pas de boues et permettent d'évaluer la consommation chimique d'oxygène des différentes dilutions d'eau noire.

Les valeurs corrigées où l'effet de la consommation chimique en oxygène est éliminé permettent de tracer les courbes de respiration en présence de glucose présentées à la figure 3.

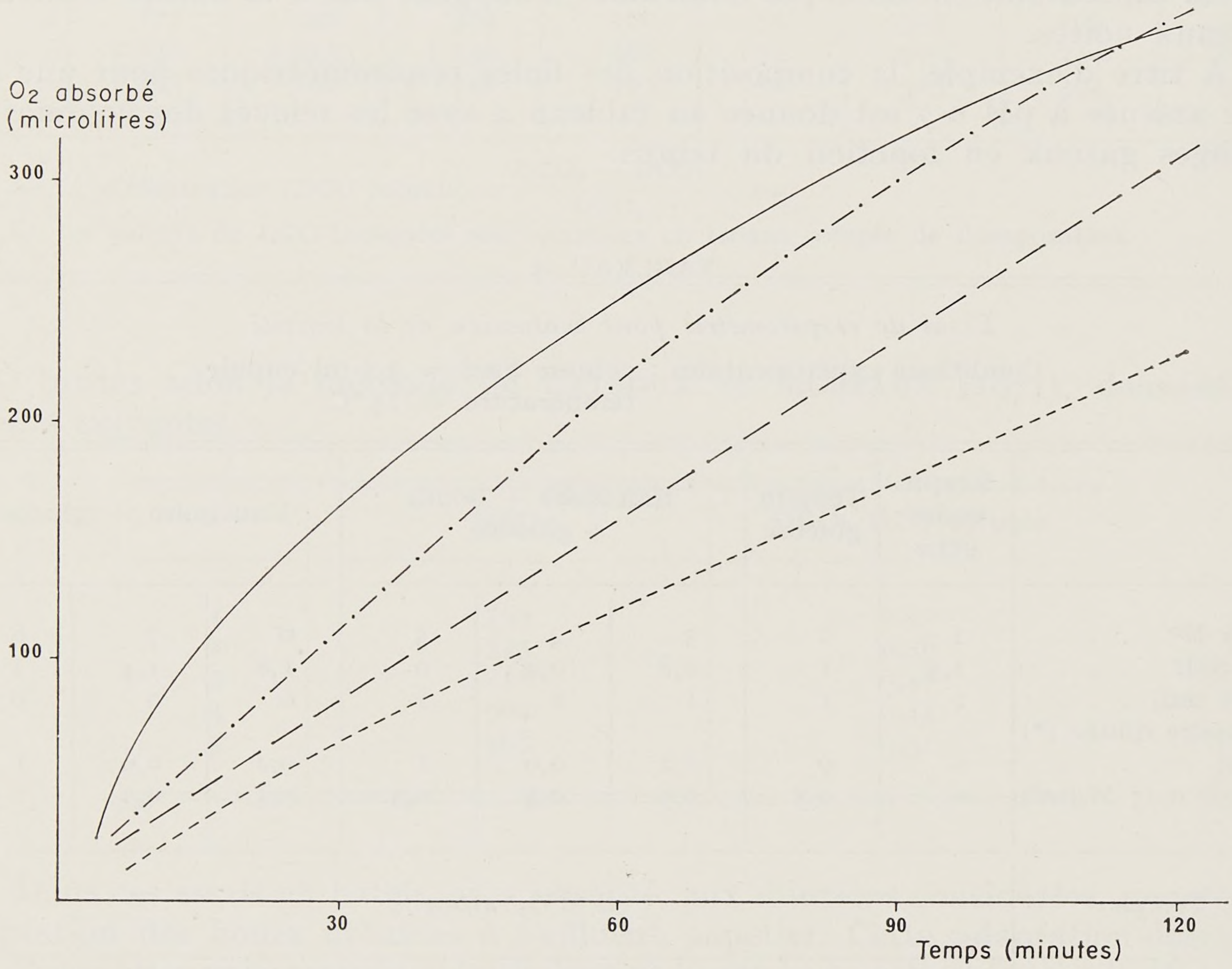


FIG. 3. — *Respirométrie sur l'eau noire de l'usine I à pH 7 en présence de glucose.*

———————— glucose seul.
—.—.—.—. eau noire diluée au 1/250e.
— — — — —eau noire diluée au 1/83e.
- - - - - - - - - eau noire diluée au 1/50e.

Un résumé des résultats respirométriques concernant l'eau noire de l'usine I (DCO 217 800 mg O_2/l) est donné au tableau 5.

L'eau noire non traitée inhibe totalement la respiration dès la dilution au 1/50e. La toxicité est évidemment progressivement atténuée pour des dilutions croissantes. Mais, à concentrations égales en liqueur noire, l'ajustement du pH au voisinage de la neutralité suffit à réduire de façon sensible cet effet inhibiteur.

L'aération préalable de 2 h de l'eau noire neutralisée accentue encore la levée de l'effet toxique par élimination des composés sulfurés.

Sur un plan pratique, cet essai de toxicité a permis de définir les conditions d'alimentation pour l'essai pilote en continu : pour réduire l'effet toxique de cette

TABLEAU 5

Effet des eaux noires sur la vitesse de respiration des boues activées
(vitesses de respiration exprimées en microlitres d'O_2 absorbé /mn)

Eau noire non traitée				Eau noire amenée à pH 6-7				Eau noire pH 6-7 aérée 2 h			
Témoin glu-cose	Dilutions			Témoin glucose	Dilutions			Témoin glucose	Dilutions		
	1 /50	1 /83,3	1 /250		1 /50	1 /83,3	1 /250		1 /50	1 /83,3	1 /250
5,4	0	1,1	3,3	5,75	2,35	2,5	3,55	5,25	3,25	4	4,1

eau noire sur les boues, on a choisi de la diluer au 1 /100^e^ et de l'amener à pH 6-7 à l'aide d'acide phosphorique; cet acide assure en même temps la supplémentation en phosphore.

B) *Essais pilotes.*

Les essais pilotes de laboratoire ont été effectués sur des eaux noires diluées et supplémentées en azote et en phosphore et sur des eaux noires mélangées à des eaux urbaines (traitement mixte).

La composition type d'une eau d'alimentation du pilote supplémentée est la suivante :

Liqueur noire .	10 ml
Urée .	65 ml
Antimousse Rhodorsil 426 au 1 /10^e	5 ml
H_3PO_4 5N .	4 ml
Eau du robinet q.s.p.	1 000 ml

Dans le cas d'un traitement mixte, l'eau noire était diluée dans une eau usée domestique prélevée à l'entrée d'une station d'épuration et filtrée sur toile de nylon. Aucune supplémentation en azote et en phosphore n'est alors effectuée. L'eau domestique apporte environ 70 mg /l d'azote total et 8 mg /l de phosphore total. Les eaux ainsi préparées sont réparties en fioles de 1 l et congelées jusqu'à utilisation.

Un schéma type de l'installation pilote est donné à la figure 4. Les caractéristiques communes aux divers montages utilisés sont :

Volume en aération : 1 500 ml.

Volume en décantation : 200 ml.

Surface du décanteur : 95 cm^2.

Aération et homogénéisation par barbotage d'air comprimé saturé d'eau.

Le système prototype de régulation automatique des matières en suspension représenté à la figure 4 n'a été utilisé que pour une partie des essais. Un biophotomètre effectue une mesure néphélométrique sur un échantillon prélevé dans le bassin de boues activées. Le signal qu'il délivre est linéarisé pour le rendre proportionnel à la concentration en matières en suspension. Ce signal permet d'asservir

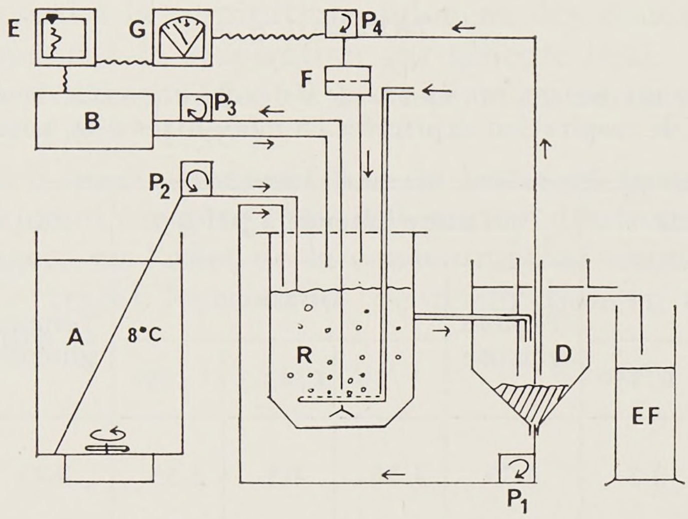


FIG. 4. — *Schéma du pilote de traitement biologique.*

A = réservoir d'alimentation
R = réacteur (bassin d'aération)
D = décanteur
P1 = pompe recyclage boues programmée
P2 = pompe d'alimentation
EF = effluent.

Régulation des matières en suspension

B = biophotomètre
E = enregistreur
G = galvanomètre à point de consigne
P3 = pompe échantillonneuse biophotomètre
P4 = pompe de prélèvement de boues
F = système de filtration des boues.

la mise en route d'une purge de boues lorsqu'il dépasse la valeur seuil que l'on a fixée. Dans les cas où ce dispositif n'est pas utilisé, le maintien du taux de matières en suspension à la valeur choisie est assuré par des ponctions manuelles effectuées sur les boues. La quantité à éliminer est évaluée d'après les mesures de MeST et cette élimination se fait par filtration d'un volume déterminé de la liqueur mixte du bassin d'aération, le filtrat étant réintroduit dans le système.

Divers régimes de charge ont été utilisés. Les contrôles comportent des mesures quotidiennes de matières en suspension totales (MeST) dans le bassin d'aération, des prélèvements journaliers à l'entrée et à la sortie (congelés jusqu'à leur analyse), des observations microscopiques des boues. La concentration en boues activées a été maintenue à la valeur choisie par des ponctions faites manuellement sur le volume adéquat. Dans le cas des pilotes fonctionnant avec le système de régulation des matières en suspension tel qu'il est représenté sur la figure 4, les boues en excès étaient prélevées automatiquement et la production régulière de boues a pu être évaluée.

Les diverses caractéristiques de fonctionnement des pilotes ayant été mis en œuvre et les rendements d'élimination de DCO obtenus sont présentés au tableau 6.

Quels que soient les régimes de charge massique utilisés, moyenne charge ou aération prolongée, les temps de séjour hydrauliques ne sont jamais inférieurs à 12 h et sont donc supérieurs à ceux rencontrés dans les stations d'épuration urbaines. Les rendements d'épuration exprimés en DCO sont de l'ordre de 65 p. 100 dans le cas d'eaux noires supplémentées en N et P, et de l'ordre de 75 p. 100 lorsqu'on les traite en mélange avec des eaux urbaines.

L'observation microscopique des boues a montré une flore très variée où les protozoaires étaient toujours présents et les rotifères fréquents. L'apparition de bactéries filamenteuses a été notée dès que les boues ont été stabilisées au régime continu choisi. Malgré leur relative abondance, les filaments n'ont provoqué aucun accident de décantation et l'indice de Mohlman des boues a toujours été inférieur à 150.

TABLEAU 6

Épuration biologique des eaux noires en pilote de laboratoire : Caractéristiques et résultats

Numéro de l'essai	Eau noire suppl. en N et P		Eau noire + eau usée domestique					
	Z 1	Z 2	Z 3	Z 4	Z 5	B 1	B 2	B 3
DCO entrée (mg O_2/l) . .	2 600	5 200	740	750	910	1 070	1 130	830
DCO sortie (mg O_2/l) . .	1 000	1 700	175	233	230	260	260	180
% d'élimination en DCO	62	67	76	69	75	76	77	78
MeST (g/l)	4	4	3	3	3	1,8	1,7	1,6
Q (ml/h)	65,2	35,7	26,8	57,7	125	88,2	83,2	88,2
Cm (kg DCO/kg boues-jour)	0,67	0,76	0,14	0,34	0,58	0,8	0,9	0,7
Cm (kg DBO_5/kg boues-jour)	0,27	0,3	0,06	0,14	0,23	0,32	0,36	0,28
Cv (kg DCO/m^3-jour) . .	2,67	2,98	0,32	0,68	1,79	1,49	1,51	1,15
Cv (kg DBO_5/m^3-jour) .	1,06	1,2	0,13	0,27	0,7	0,6	0,6	0,46
Temps de séjour $\frac{V}{Q}$ (h). .	23	42	56	26	12	17	18	17
Production de boues (kg/kg DCO éliminée)	—	—	—	—	—	0,35	0,38	0,29

Cm = charge massique = rapport entre la quantité de pollution appliquée journellement à la station (en kg/j de DCO ou de DBO_5) et la quantité totale de boues dans le système (en kg).
Cv = charge volumique = rapport entre la quantité de pollution appliquée journellement à la station (en kg/j de DCO ou de DBO_5) et le volume en aération (en m^3).
Régime de faible charge ou aération prolongée = Cm (en DBO_3) < 0,1.
Régime des moyennes charges = 0,2 < Cm (en DBO_5) < 0,6.
Z = eau noire provenant de l'usine I; B = eau noire provenant de l'usine II; V = volume en aération en ml; Q = débit d'alimentation en ml/h.

Les effluents des pilotes sont troubles dans la période de démarrage et deviennent limpides au bout d'une dizaine de jours. La coloration de ces effluents est jaune-brun clair et leur pH est voisin de 8. Cette coloration est attribuée aux dérivés des lignines non biodégradées.

Des rendements d'épuration en DCO de l'ordre de 60 à 70 p. 100 ont pu être obtenus sur des pilotes fonctionnant en continu à des régimes de moyenne charge massique, sur des eaux noires supplémentées en azote et phosphore. Dans le cas d'épuration mixte en présence d'eaux résiduaires domestiques, on parvient à éliminer 70 à 80 p. 100 de la DCO. L'apport des substances biodégradables par l'eau usée domestique peut expliquer ces meilleurs rendements.

Les rendements obtenus sont relativement satisfaisants compte-tenu de la faible biodégradabilité des eaux noires et sont comparables à ceux publiés dans la littérature (GANCZARCZYK, OBIAGA, 1974).

La partie biodégradable des liqueurs noires est vraisemblablement constituée par des produits de dégradation des hémicelluloses (hydroxyacides et lactones) et de faibles quantités de méthanol provenant de la déméthoxylation des lignines.

Les lignines solubilisées sous forme d'alcali-lignines dont les poids moléculaires s'étalent sur un large domaine, constituent la partie prépondérante de la pollution et offrent une grande résistance à l'attaque microbienne. Il a été montré (GANCZARCZYK, 1973) que la principale voie d'élimination des alcali-lignines était les purges de boues en excès. L'épuration partielle de ces composés réfractaires s'effectuerait par un mécanisme physique d'adsorption sur les flocs des boues activées au cours de la traversée de la station d'épuration. Les boues présentent en effet une coloration foncée caractéristique. Il est certain d'autre part qu'une fraction des alcali-lignines est susceptible de floculer sous l'effet d'un abaissement de pH et de se trouver mêlée aux flocs microbiens.

Les alcali-lignines non éliminées confèrent à l'effluent une couleur jaunâtre et une DCO résiduelle non négligeable. Bien que sans danger immédiat sur le milieu récepteur, un tel effluent reste justifiable d'une épuration plus poussée visant à éliminer couleur et DCO. Les méthodes proposées dans la littérature vont de la précipitation tertiaire par le fer ou la chaux à l'adsorption sur résines échangeuses d'ions. Ces traitements coûteux ne sont pas actuellement couramment utilisés mais peuvent être rendus obligatoires dans un proche avenir.

IV. — Conclusion

Les eaux noires concentrées de papeterie Kraft utilisant le chanvre et le lin comme matières premières peuvent se prêter à une épuration biologique par boues activées sous certaines conditions. Leur alcalinité élevée et la présence de sulfures et de mercaptans impliquent qu'une dilution convenable soit réalisée avant le traitement biologique afin de réduire l'effet toxique. Un ajustement du pH peut être éventuellement requis. Dans le cas où un traitement mixte avec des eaux urbaines est exclu, ces eaux doivent également être supplémentées en azote et en phosphore.

Des pilotes de laboratoire ont fonctionné en continu pendant des périodes dépassant trois semaines en utilisant le procédé des boues activées; des rendements d'épuration en DCO de l'ordre de 60 à 80 p. 100 ont pu être obtenus. La présence de bactéries filamenteuses n'a causé aucun problème sérieux de décantation. L'élimination des dérivés de la lignine n'est que partielle et semble mettre en jeu des phénomènes physico-chimiques d'adsorption sur les flocs de boues activées. Le reste de ces composés faiblement biodégradables se retrouve dans l'effluent auquel il confère une couleur jaune qui peut constituer une nuisance pour le milieu récepteur.

Les essais effectués sur des eaux noires provenant de deux usines distinctes ont donné des résultats identiques. Sur l'une des deux usines rejetant ses effluents dans une station d'épuration urbaine, il a été construit, à la suite des essais, un bassin tampon équipé d'une boucle de régulation de pH permettant d'homogénéiser les effluents papetiers et de les introduire de façon régulière dans le réseau d'égouts. L'élimination des pointes de débit et de pH a permis d'améliorer sensiblement le régime de la station d'épuration.

Reçu pour publication en janvier 1977.

Summary

Biological treatment in pilot plants of black liquors from Kraft paper factories

Black liquors from two Kraft paper mills have been subjected to biodegradation assays. Their toxicity on activated sludge was assessed through respirometric tests. Studies on bench scale activated sludge pilot plants have indicated that COD reductions ranging of 60 up to 80 p. cent could be expected with this kind of treatment provided that the wastewater was either supplemented with nitrogen and phosphorus or treated together with domestic sewage. The biological treatment does not eliminate effluent color which is due to some refractory lignin derivatives.

Références bibliographiques

Catroux G., Morfaux J. N., 1971. Une nouvelle technique de détermination de la demande biochimique en oxygène des eaux résiduaires. *Ind. Alim. Agric.*, **88**, 12, 1699-1704.

Ganczarczyk J., 1973. Fate of lignin in Kraft effluent treatment. *J. Water Poll. Control Fed.*, **45**, 9, 1898-1907.

Ganczarczyk J., Obiaga T., 1974. Mechanism of living removal in activated sludge treatment of pulp mill effluents. *Water Res.*, **8**, 857-862.

Liao C. F. H., Dawson R. N., 1975. Microbiology of two stage kraft waste treatment. *J. Water Poll. Control Fed.*, **47**, 10, 2384-2396.

Morfaux J. N., Sarris J., 1974. Détermination automatique de la DCO. Étude critique de l'oxydation de quelques corps purs. *La Tribune du Cebedeau*, **363**, 1-8.

Obiaga T., Ganczarczyk J., 1972. Biological removal of lignin from Kraft mill effluents — II Changes in molecular size distribution. Publication 72-08, Department of Civil Engineering, University of Toronto.

Wyckoff B. M., 1964. Rapid solids determination using glass fibers filters. *Water et Sew. Works*, **111**, 227-280.

TABLE DES MATIÈRES DE L'ANNÉE 1977

G. ALBAGNAC, J. N. MORFAUX. — Composition de la fabrication glucidique des eaux de fabrication de panneaux de fibre à partir de bois de feuillus 199

S. AUBERT, R. DUMAS de VAULX. — Test de fermeté non destructif pour contrôler la maturité du melon . 243

R. BITTEL, A. FOURCY, B. GODON, G. MOURIOUX. — Transfert de métaux lourds dans la chaîne de panification . 189

R. BROCKMANN, L. ACKER. — Activité de la lipoxygénase et activité de l'eau dans les systèmes à faible teneur en eau . 167

B. CAHAGNIER, CUC N'GUYEN THI, Jeanne POISSON, J. P. MELCION, J. ROUGEOT. — Stockage d'aliments composés pour rats et visons après addition d'agents conservateurs . . 59

A. CARD, C. AVISSE. — Étude comparative des arômes de champignons crus et cuits (*Agaricus Bisporus L.*) . 287

J. CERNING-BEROARD, C. MERCIER, A. GUILBOT. — Composition glucidique du blé 79

A. J. COURTOISIER. — Dosage complexométrique du calcium et du magnésium par utilisation conjuguée de deux agents . 1

M. C. DIECKERT, J. W. DIECKERT. — Paramètres structuraux de l'enveloppe génétiquement déterminée affectant la contamination des graines d'arachides par des Aspergillii producteurs d'aflatoxine . 353

R. DUDEN, K. H. PARK, A. FRICKER. — Détermination des activités phospho- et galactolipasiques dans un matériel végétal . 161

R. DUMAS de VAULX, S. AUBERT. — Évolution comparée des fruits de deux cultivars de melon « Doublon et Védrantais » (type Charentais), au cours des derniers jours de la maturation . 227

N. A. M. ESKIN, H. M. HENDERSON. — Une étude de la lipoxygénase de lentilles et de lupins 139

M. FEUILLAT, P. BIDAN, Y. ROSIER. — Croissance des bactéries lactiques à partir des principaux constituants azotés du vin . 435

H. W. GARDNER, D. J. SESSA. — Comparaison des modes de dégradation des hydropéroxydes d'acides gras par les céréales et une légumineuse 151

C. GIDDEY, J. BRANDT, G. BUNTER. — La détoxification des tourteaux de graines oléagineuses pollués par aflatoxines. Recherche et développement d'un procédé industriel 331

W. GROSCH, F. WEBER, K. H. FISCHER. — Décoloration des caroténoïdes par la lipoxygénase . 133

M. LAROCHE. — Influence des teneurs en eau, en chlorures de sodium et de calcium, sur le comportement mécanique de protéïnes de soja filées 305

B. LESIEUR, J. COLLIN. — Mise au point d'un procédé industriel pour le traitement des tourteaux d'arachides contaminés par l'aflatoxine 367

R. MARET, T. SOZZI. — Flore malolactique de moûts et de vins du Canton du Valais (Suisse), I. lactobacilles et pédiocoques . 255

M. MARINOV, T. IVANOV. — Influence de la fermentation continue sous pression de CO_2 sur la composition des eaux-de-vie de vin 449

J. NICOLAS, R. DRAPRON. — Quelques caractéristiques physicochimiques de la lipoxygénase de la fève (*Vicia Faba* L.) . 119

J. C. NOEL, J. P. VELLAUD. — Prévention et lutte contre les pollutions et nuisances des industries de la canne à sucre . 215

A. OURNAC, C. POUX, P. ANDRÉ, M. BURET, Y. CHAMBROY, C. FLANZY. — Évolution de la vitamine C au cours du métabolisme anaérobie de la baie de raisin 275

H. E. PATTEE, J. A. SINGLETON. — Isolement des isomères positionnels et géométriques des hydropéroxydes et effets de certains paramètres sur leur pourcentage de formation. . 295

J. PELHATE. — Protection des fourrages ensilés contre la spoliation fongique 319
R. E. PETTIT, R. A. TABER, O. D. SMITH, B. L. JONES. — Réduction de la contamination mycotoxine des arachides par développement de variétés résistantes 343
M. RENERRE. — Purification rapide et sous forme non oxydée de la myoglobine des viandes de bovins, ovins et porcins . 419
F. SAUZE. — Étude du taux d'oxygène dissous et de divers paramètres dans un effluent d'eaux résiduaires domestiques traité par lagunage 25
F. SAUZE. — Étude du coefficient de vitesse de dégradation caractérisant l'évolution des eaux polluées lagunées . 39
R. TOMASSONE, C. FLANZY. — Présentation synthétique de diverses méthodes d'analyse de données fournies par un jury de dégustateurs 373
J. P. TOUZEL, J. N. MORFAUX. — Épuration biologique en pilotes de laboratoire des liqueurs noires de papeteries Kraft . 511
G. VANGHEESDAELE, Nicole FOURNIER. — Origine et rôle du cuivre et du fer dans la fabrication de la moutarde de Dijon. 487
G. VANGHEESDAELE, Nicole FOURNIER. — La dégradation des thioglucosides par les sels de cuivre (application au dosage de la sinigrine dans les graines de moutarde) 499
P. VAROQUAUX, J. SARRIS, G. ALBAGNAC. — Dosage spectrophotométrique automatique de l'activité *o*-diphénoloxydasique du champignon de Paris (*Agaricus Bisporus* L.). . 461
P. VAROQUAUX, J. SARRIS, G. ALBAGNAC. — Action des antioxydants et de la chaleur sur l'*o*-diphénoloxydase du champignon de Paris (*Agaricus Bisporus* L.) 473
J. F. G. VLIEGENTHART, G. A. VELDINK. — Sur le mécanisme des réactions catalysées par la lipoxygénase des plantes . 175
D. M. WILSON, E. JAY, O. M. HALE, L. H. HUANG. — Conservation sous atmosphère contrôlée de maïs et d'arachides à humidité élevée pour suivre la production d'aflatoxine . 339

RECOMMANDATIONS AUX AUTEURS

Le manuscrit doit être dactylographié sur papier format 21 × 29,7, avec un double interligne, au recto seulement. Chaque page sera numérotée et des feuilles *séparées* seront utilisées pour les références bibliographiques, les tableaux, les légendes des figures et graphiques, etc.

Au début de chaque mémoire, on indiquera : — *le titre du mémoire;* il ne devra pas comporter d'abréviations ni de formules chimiques (sauf pour les isotopes); — *le nom des auteurs*, précédé des initiales du prénom pour les hommes, du prénom complet pour les femmes; — *le nom des techniciens* ayant collaboré à l'étude relatée, précédé de la mention : avec la collaboration technique de...; *le nom de l'établissement*, dans lequel ont été effectuées les recherches et son adresse.

Les mémoires seront rédigés, autant que possible, d'après le plan ci-dessous :
a) *résumé* (250 mots max.) suffisamment précis pour que sa lecture renseigne sur la nature du travail et son importance; b) *introduction* dans laquelle on indique l'objet des recherches entreprises en relation avec les travaux déjà effectués dans le domaine; c) *techniques expérimentales et matériel utilisé*, en donnant, sous une forme concise, tous les détails nécessaires pour que le lecteur puisse répéter les expériences; d) *résultats*, à présenter de la manière la plus brève possible; e) *discussion* et *conclusion ;* f) *titre et résumé* en anglais ou destiné à être traduit en anglais comportant une analyse *complète* de l'article; g) *remerciements* pour les collaborations, les fonds, les dons...; h) *références bibliographiques*.

Les travaux originaux en anglais doivent présenter la même composition que les mémoires rédigés en français, mais ils comportent obligatoirement un résumé français *très complet*. Les figures, graphiques, tableaux et photographies seront sous-titrés en français.

Pour les autres documents (notes, mises au point, revues, rapports, etc.), l'auteur devra suivre un plan logique et le mettre en évidence par une titration appropriée.

Les références bibliographiques doivent être citées dans le texte de la manière suivante : (DUPONT et DUVAL, 1954). Lorsque la référence comporte plus de trois auteurs, seul le premier sera mentionné, suivi de *et al*. A la fin de l'article, les références constituant la bibliographie doivent être citées par ordre alphabétique des noms d'auteurs, et par ordre de dates pour un même auteur.

Pour les articles : le (s) nom (s) de (s) auteur (s) suivi (s) des initiales du (des) prénom (s); la date de parution de l'article; le titre de l'article (dans la langue originale pour l'allemand, l'anglais, l'italien, l'espagnol et en français dans tous les autres cas, avec indication entre parenthèses de la langue d'origine, sauf si l'auteur étranger a sous-titré dans l'une des quatre langues mentionnées) : le titre du périodique en abrégé, selon la *World List of Scientific Periodicals*, ou le *Bulletin Signalétique du C.N.R.S. ;* le volume, la première et la dernière page de l'article.

Pour les ouvrages : le nom de l'auteur avec les initiales du prénom; la date de l'édition; le titre complet de l'ouvrage dans la langue originale, sans abréviations (pour les langues utilisant des alphabets autres que l'alphabet latin, la traduction du titre sera donnée entre parenthèses, avec mention de la langue d'origine); le volume; la première et la dernière page du paragraphe se rapportant aux résultats discutés, et, si l'on cite l'ouvrage en entier, le nombre de volumes et le nombre total de pages; le numéro de l'édition s'il y en a plusieurs; l e nom de l'éditeur; le lieu de l'édition. Si l'ouvrage est collectif, on indiquera en plus le nom de l'auteur du chapitre cité, le nom des rédacteurs principaux, précédé de la mention « in », le titre de l'ouvrage.

La mention de « communications personnelles » ou « données non publiées » etc. doit être faite entre parenthèses. Lorsque l'auteur a relevé une référence dans une revue d' «Abstracts», le mentionner à la fin de la référence, entre parenthèses.

Les tableaux, dessins, graphiques, cartes, photographies, doivent être fournis à part. Les tableaux et figures doivent faire l'objet de deux numérotations distinctes, en chiffres arabes l'une et l'autre.

Les auteurs peuvent disposer leurs tableaux soit dans le sens de la largeur de la revue, soit dans le sens de la longueur. Dans le sens de la largeur, le total des signes et des espaces disponibles est de 100. Dans le sens de la longueur, il est de 155. Les tableaux en longueur, c'est-à-dire ceux pouvant disposer de 155 signes, ne seront admis que s'ils comprennent plus de 8 lignes de chiffres, de manière qu'une page entière de la revue ne soit pas occupée par un tableau très long et très étroit. Les graphiques ne doivent pas faire double emploi avec les tableaux. *Il est demandé aux auteurs de bien vouloir fournir une traduction anglaise des titres et contenus de tableaux, figures, photographies, etc...*

Le titre courant pour les hauts de pages devra être fourni en 40 signes au maximum.

Les légendes et les énoncés des graphiques et dessins doivent être dactylographiés sur une même feuille séparée et porter les numéros des figures.

Les graphiques, schémas, cartes, dessins d'appareils seront envoyés soit *à l'état définitif* soit *à l'état de projets*, leur exécution définitive étant confiée au Bureau de Dessin de l'I.N.R.A. Seules deux réductions à l'impression sont admises : *soit* × 0,5, *soit* × 0,25.

Il est rappelé que le format utile des *Annales* est: 12,5 × 19,5 cm; ces dimensions ne doivent pas être dépassées.

Photographies : Il est recommandé de fournir des épreuves bien contrastées sur papier blanc, et de préférence en format 9 × 12. Si les photographies doivent être associées pour constituer des planches, on adoptera les normes suivantes : 2 photos : 9 × 12; 4 photos : 9 × 5,5; 6 photos : 5,5 × 5,5. Dans ce cas, chaque photo devra porter un numéro en chiffres arabes visible après clichage.

Les légendes des photographies doivent être dactylographiées sur une même feuille séparée et porter les numéros des figures.

Il est demandé d'indiquer sur le manuscrit, dans la marge, en regard du texte, l'emplacement souhaité des tableaux et figures.

Envoi du manuscrit : M. BOURDET, Laboratoire de Technologie des Blés, 16, rue Nicolas-Fortin, 75013 Paris, ou M. DUPUY, Chef du Département de Techonologie des Produits végétaux, Centre de Recherches de Dijon, 21034 Dijon Cedex. On demande trois exemplaires illustrations comprises.

Correction des épreuves : les épreuves que les auteurs recevront à corriger sont à retourner, après correction, à cette même adresse.

Le Directeur de la publication: M.-L. CAGNAC

F.D. Imprimerie Alençonnaise, rue Edouard-Belin, 61002 Alençon

Dépôt légal: 2e trimestre 1978. N° d'impression: 89964

CPPAP n° 26017